

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Tecnologia, Ambiente e Sociedade

Lara Franca Colares

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES EM CINCO ESPÉCIES VEGETAIS
NOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

Teófilo Otoni-MG

2016

Lara Franca Colares

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES EM CINCO ESPÉCIES VEGETAIS
NOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia, Tecnologia e Gestão.

Orientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves
Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Alessandra de Paula Carli.

Teófilo Otoni-MG

2016

Ficha Catalográfica
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM
Bibliotecário responsável: Gilson Rodrigues Horta – CRB6 nº 3104

C683d Colares, Lara Franca.
2016 Detecção de inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. / Lara Franca Colares. Teófilo Otoni: UFVJM, 2016.
58 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Alessandra de Paula Carli.

1. Inibidor de proteases. 2. Sementes de *punica granatum*. 3. Folhas de *anadenanthera colubrina*. 4. Plantas medicinais. I. Título.

CDD: 580


Lara Franca Colares

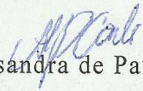
**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES EM CINCO ESPÉCIES VEGETAIS
NOS VALES DO JEQUITINHO E MUCURI**

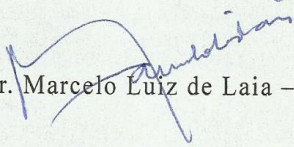
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia, Ambiente e Sociedade,
nível de Mestrado, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

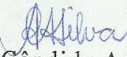
Orientador: Prof. Dr. Caio Cesar de
Souza Alves
Coorientadora: Profa. Dra.
Alessandra de Paula Carli

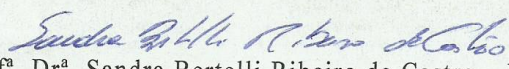
Data da aprovação 21/07/2016


Prof. Dr. Caio Cesar de Souza Alves – UFVJM


Profª. Drª. Alessandra de Paula Carli – UFVJM


Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia – UFVJM


Profª. Drª. Ana Cândida Araújo e Silva – UFVJM


Profª. Drª. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro – UFJF

Teófilo Otoni

Aos meus pais e minha irmã, meus tesouros divinos.
Aos meus familiares, amigos e namorado.
Obrigada por tamanho carinho, atenção e compreensão de sempre.

AGRADECIMENTOS

A Ele por ser o Senhor de todas as coisas, obrigada Deus por ser presente e se fazer realizar a conquista de mais um sonho;

Aos meus pais, Cristalino e Margarete, meus tesouros divinos, e maiores incentivadores de toda a minha caminhada, aqueles que sorriram e sofreram comigo, dividindo todos os sentimentos de cada momento. Obrigada pelo amor incondicional, a dedicação extrema e as orações, vocês são meus exemplos de vida;

À minha irmã, Laysa, minha outra metade, pela paciência e ajuda dedicados todos os dias e momentos de maior e menor necessidade;

Ao Renan, pelo companheirismo, paciência, incentivo, confiança e amor. Obrigada por me compreender, me escutar e me apoiar em todos os momentos dessa caminhada e da vida;

Ao meu tio Gaspar, em especial pelo imenso incentivo, pelo apoio, disponibilidade e por ter sido um dos principais responsáveis pela realização de mestrado;

Aos meus tios-pais, Nilo e Bela, e à minha prima-irmã, Lorena, pelo acolhimento e aconchego de um lar abençoado e alegre;

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio e incentivo e por sempre acreditarem que eu era capaz. Obrigada pelas recargas de energia e pelos momentos felizes;

Ao professor Dr. Caio César de Souza Alves, pela orientação, pelos conhecimentos divididos e pela confiança depositada em mim;

À professora Dr^a. Alessandra de Paula Carli, pela orientação, ensinamentos diversos e pela confiança depositada em mim. Obrigada pela amizade e momentos únicos que vivemos juntas;

Ao professor Dr. Marcelo Luiz de Laia, por toda a assistência e disponibilidade em ajudar no decorrer da fase laboratorial desse estudo;

Ao professor Dr. Ronaldo Luis Thomasini, pela assistência, disponibilização de equipamentos e pelos conhecimentos transmitidos;

Ao professor Dr. Rodrigo Moreira Verly e toda equipe do LASEB - Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas UFVJM / Campus JK, pelo apoio, credibilidade, assistência,

disponibilidade de equipamentos na execução de alguns experimentos e análises, enfim a toda ajuda e ensinamentos transmitidos para desenvolvimento desse estudo;

Aos meus companheiros de laboratório, peço licença para não nomear cada um, mas os quais dividimos alegrias e angustias, além de muito trabalho. Obrigada pela ótima convivência;

Aos técnicos de laboratórios Tiago e Leyde, e todos os demais, pela disponibilização de equipamentos e auxílio na execução de alguns experimentos;

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra, direta ou indiretamente, para a finalização desse estudo e concretização desse sonho. Obrigada pela torcida e pelos votos de boa sorte, foram fundamentais.

RESUMO

Plantas medicinais são comumente usadas por comunidades tradicionais, principalmente em regiões com menor desenvolvimento humano. Algumas espécies vegetais possuem entre seus componentes substâncias denominadas inibidores de proteases. Os inibidores de proteases se destacam na proteção de fluidos e tecidos contra sua degradação por proteólise e possíveis falhas na degradação de proteínas de meia-vida que podem interferir de forma drástica nas funções celulares. Diante do exposto, esse estudo objetivou identificar e caracterizar inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nativas do Cerrado e da Mata Atlântica. As espécies de *Punica granatum* L. (Romã), *Plantago major* L. (Tansagem), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca), *Anadenanthera colubrina* Vellozo (Angico) e *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville (Barbatimão) foram selecionados nas cidades de Poté, Ladainha, Ataléia, Teófilo Otoni e Araçuaí, devido ao seu uso tradicional como anti-inflamatório. A sequência genômica de inibidores de proteases foi pesquisada para essas espécies vegetais no GenBank, mas nenhuma sequência foi descrita para as espécies selecionadas. As amostras provenientes dos procedimentos de extração foram submetidas à quantificação de proteínas e a presença dos inibidores de proteases foi detectada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. Somente os extratos das sementes de *Punica granatum* e das folhas do *Anadenanthera colubrina* tiveram detecção satisfatória de inibidores de proteases e foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de HPLC. Este trabalho demonstra pela primeira vez a detecção e extração de inibidores de proteases em folhas de *Anadenanthera colubrina* e sementes de *Punica granatum*.

Palavras-chaves: Inibidor de proteases. Sementes de *Punica granatum*.

Folhas de *Anadenanthera colubrina*. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Traditional communities, especially in regions with lower human development, commonly use medicinal plants. Some plant species have among their components substances called protease inhibitors. Protease inhibitors act protecting fluids and tissues from degradation by proteolysis and possible failures in the degradation of half-life proteins that can drastically interfere with cellular functions. This study aimed to identify and characterize protease inhibitors in five native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. The species of *Punica granatum* L. (Romã), *Plantago major* L. (Tansagem), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca), *Anadenanthera colubrina* Vellozo (Angico) and *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville (Barbatimão) were selected in the cities of Poté, Ladainha, Ataléia, Teófilo Otoni and Araçuaí due to their traditional use. The genomic sequence of protease inhibitors was screened for these plant species in GenBank, but no sequence was described for the selected species. Samples from the extraction procedures were subjected to protein quantification and the presence of protease inhibitors was detected by 12% SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. Only the extracts of the seeds of *Punica granatum* and of the leaves of *Anadenanthera colubrina* had satisfactory detection of proteases inhibitors and were submitted to the analysis by high performance liquid chromatography system. This work demonstrates for the first time the detection and extraction of protease inhibitors in leaves of *Anadenanthera colubrina* and seeds of *Punica granatum*.

Keywords: Protease inhibitor. *Punica granatum* seeds. *Anadenanthera colubrina* leaves. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore de <i>Anadenanthera colubrina</i>	16
Figura 2 - Folhas e Inflorescências do <i>Stryphnodendron adstringens</i>	18
Figura 3 - Árvore de <i>Punica granatum</i>	19
Figura 4 - <i>Plantago major</i>	20
Figura 5 - Subarbusto de <i>Ocimum gratissimum</i>	21
Figura 6 - Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de folhas de <i>Anadenanthera colubrina</i> obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).....	36
Figura 7- Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de sementes de <i>Punica granatum</i> obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).....	37
Figura 8- Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos enriquecidos a base de folhas e inflorescências de <i>Ocimum gratissimum</i> obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).....	38
Figura 9- Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos enriquecidos sem bandas de inibidores de proteases obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).....	39
Figura 10 - Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos a base de folhas de <i>A. colubrina</i> , sementes de <i>P. granatum</i> e <i>G. max</i> grão em espectrofotômetro.....	40
Figura 11 - Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura das amostras dos extratos enriquecidos a base de folha de <i>A. colubrina</i> , sementes de <i>Punica granatum</i> e grãos de <i>Glycine max</i>	42
Figura 12 - Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecido a base de folha de <i>Anadenanthera colubrina</i>	43
Figura 13 - Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecido a base de sementes de <i>Punica granatum</i>	44
Figura 14 - Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecidos a base de <i>Glycine max</i> grão.....	45
Gráfico 1 - Quantificação de inibidores de proteases dos extratos enriquecido das folhas das espécies selecionadas e do padrão de soja.....	34

Gráfico 2 - Quantificação de inibidores de proteases dos extratos enriquecido de sementes e inflorescências e do padrão de soja.....	35
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial Zeta e distribuição de tamanho das partículas dos inibidores de proteases.....	46
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Plantas e seu uso medicinal.....	15
3.1.1 <i>Anadenanthera colubrina</i> (Angico).....	16
3.1.2 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Barbatimão).....	17
3.1.3 <i>Punica granatum</i> (Romã).....	18
3.1.4 <i>Plantago major</i> (Tansagem).....	20
3.1.5 <i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca)	21
3.2 Proteases	22
3.3 Inibidores de proteases.....	23
3.3.1 Inibidores de proteases do tipo Kunitz.....	25
3.3.2 Inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Isolamento e Purificação dos inibidores de proteases	28
4.1.1 <i>Obtenção do extrato enriquecido das espécies vegetais</i>	28
4.2 Dosagem de proteínas.....	29
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS: Detecção dos inibidores de proteases por eletroforese	29
4.4 Varredura do comprimento de onda	30
4.5 Purificação de inibidores de proteases por cromatografia líquida de alta eficiência	30
4.6 Distribuição do tamanho e potencial Zeta dos inibidores de proteases.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Submissão ao GenBank.....	32

5.2 Isolamento e Purificação dos inibidores de proteases	33
5.2.1 <i>Quantificação de proteínas dos extratos enriquecidos</i>	33
5.3 Detecção de inibidores de proteases por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE	35
5.4 Análise da varredura do comprimento de onda	40
5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos enriquecidos com inibidores de proteases	41
5.6 Distribuição do tamanho e potencial Zeta dos inibidores de proteases.....	46
 6 CONCLUSÃO.....	 47
 REFERÊNCIAS	 48

1 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental acarreta a perda de um acervo de conhecimentos empíricos de povos tradicionais, assim como o patrimônio genético das presentes e futuras gerações. A utilização de vegetação com propriedades medicinais e suas formas derivadas são consideradas a base da terapia através dos séculos, isso devido a inúmeras etapas terem marcado a evolução da arte de curar (MARCHESE *et al.*, 2009). Os estudos sobre os usos medicinais das plantas possibilitam a difusão do conhecimento à humanidade (PEREIRA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o uso das plantas medicinais voltou a ser reconhecido em todo o mundo, o que nos mostra a crescente valorização dos medicamentos a base de plantas pelos consumidores e o profundo interesse da indústria farmacêutica em compostos naturais que possuem propriedades farmacológicas (SIMÕES; LINO, 2003). O crescente interesse acadêmico no desenvolvimento de pesquisas com foco no conhecimento que as populações tradicionais detêm sobre plantas e seus usos demonstram oportunidade de elaboração de medicamentos fitoterápicos a base de extratos vegetais padronizados de ação eficaz, segura e de qualidade (BHATTARAM; GRAEF; KOHLERT, 2002).

As plantas biossintetizam substâncias, denominadas metabólitos secundários, que são importantes para a adaptação e a propagação das espécies vegetais (DEWICK, 2002). Os alcaloides, os terpenos e os flavonoides são alguns exemplos desses metabólitos, os quais, em sua maioria, apresentam atividades biológicas, como por exemplo, ação antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária e antiviral (COWAN, 1999; MIDDLETON *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001; COUTINHO *et al.*, 2008). Além dos metabólitos secundários, podem ser encontrados inibidores de proteases que atuam como: proteína de reserva, agente regulador de proteases endógenas, proteção dos fluídos e tecidos da degradação pela atividade proteolítica (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1997; WALKER *et al.*, 1997), e defesa direta ou indireta contra os ataques de insetos e infecções por patógenos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; LAWRENCE; KOUNDAI, 2002; TONELLI *et al.*, 2015).

Os inibidores de proteases se destacam na proteção de fluidos e tecidos (soro sanguíneo, células pancreáticas e tecidos de reserva de plantas) contra sua degradação por proteólise (RYAN, 1990; LOPES, 2006). A destruição de proteínas é necessária para manter a homeostase celular e possíveis falhas na degradação de proteínas de meia-vida ou proteólise desorganizada podem interferir de forma drástica nas funções celulares (BREGUEZ, 2012).

Assim, as pesquisas e estudos dirigidos para a busca de novos produtos naturais para fins terapêuticos se justifica pela procura de menores efeitos adversos e maior eficiência quando comparados a utilização de produtos industrializados nos processos terapêuticos de doenças como infecções, inflamações, cânceres e imunodeficiências (CLARDY; WALSH, 2004; LOPES, 2006). Diante do exposto, este trabalho selecionou cinco espécies vegetais, nativas ou ornamentais, da região dos vales do Jequitinhonha e Mucuri para avaliar a obtenção e a caracterização química de inibidores de proteases.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Identificar e caracterizar inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nativas do Cerrado e da Mata Atlântica.

2.2 Específicos

- Selecionar cinco espécies vegetais de uso medicinal tradicional;
- Consultar as sequências dos inibidores de proteases das espécies selecionadas;
- Extrair e purificar inibidores de proteases das espécies selecionadas;
- Detectar em gel de poliacrilamida inibidores de proteases obtidos das espécies selecionadas;
- Verificar a pureza dos inibidores de proteases (HPLC);
- Determinar a distribuição de tamanho e o potencial Zeta das partículas dos inibidores de proteases nos extratos enriquecidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas e seu uso medicinal

A medicina tida como moderna está bem desenvolvida e é disseminada na maior parte do mundo, porém em populações carentes 80% dos indivíduos faz o uso de práticas e técnicas tradicionais para cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam as plantas ou elaborações das mesmas para sua atenção primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Na América do Sul a utilização das plantas medicinais como opção de tratamento e sua comercialização está intimamente ligada às riquezas filogenéticas das plantas presentes em cada país, bem como sua à diversidade de tradições culturais (ALONSO, 1998). Estima-se que o país tido como detentor da maior biodiversidade do mundo é o Brasil, por possui aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas, das quais apenas 8% possuem estudos com identificação de moléculas bioativas e, 4 mil são reconhecidas como plantas medicinais (BRASIL, 2004).

A padronização de plantas medicinais teve início na década de 70, na Alemanha, com o chamado marcador químico e/ou pelo próprio princípio ativo das mesmas, possibilitando ao paciente consumidor um medicamento fitoterápico com a garantia de que no mesmo estava contida a quantidade reprodutível e necessária para obter o efeito terapêutico, sendo possível por meio da padronização a reprodução de medicamentos homogêneos (CAVALLAZZI, 2006). Para alcançar a padronização é necessária uma sequência de estudos monitorados que se iniciam com os extratos brutos, sua identificação, o isolamento e a síntese dos compostos biologicamente ativos nos mesmos, estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e por fim os estudos clínicos longitudinais (CATE; MARSH, 1994).

Os conhecimentos dos povos tradicionais a respeito dos usos eficientes das plantas de forma medicinal auxiliam significativamente na divulgação dos atributos terapêuticos das vegetações, estabelecidos atualmente pelos efeitos medicinais que fornecem, apesar de não possuírem ainda seus compostos químicos muito bem conhecidos. Diante disso, adeptos e usuários de plantas medicinais em todo o mundo, preservam o costume de consumir os fitoterápicos, validando assim informações terapêuticas que com o passar dos séculos foram sendo acumuladas (MACIEL *et al.*, 2002). As populações dos vales do Jequitinhonha e Mucuri fazem uso de espécies vegetais, dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, para a manutenção de sua saúde.

3.1.1 *Anadenanthera colubrina* (Angico)

A espécie pertence à família Fabaceae - Mimosoideae e possui como sinonímia científica os nomes *Acacia colubrina* Martius; *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan; *Mimosa colubrina* Vellozo; *Piptadenia colubrina* (Vellozo) Bentham (RAMALHO, 2002).

É um arbusto alto, com caule entre 30 e 50 cm de diâmetro (ALTSCHUL, 1964), casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado. Suas folhas são do tipo compostas bipinadas, com até 30 pares de pinas opostas com tamanho variando de 4 a 8 cm. As flores são pequenas e brancas ou amarelo-esverdeadas e juntas constituem capítulos globosos axilares ou terminais com tamanho variando de 3 a 5 cm. O fruto do Angico é uma vagem grande (até 32cm) de cor castanho-avermelhada, achatada e rugosa, e contém de 8 a 15 sementes de cor marrom-avermelhadas ou escuras (Figura 1) (LORENZI, 2002).



Figura 1: Árvore de *Anadenanthera colubrina*. Com vagens verdes e maduras, caule espiculado e folhas compostas bipinadas de *Anadenanthera colubrina*.

Na medicina popular a casca é usada como infusos, xaropes, macerados e tinturas por suas propriedades hemostáticas (GONZALEZ; SILVA, 1987), depurativas, adstringentes, antigripais e anti-inflamatórias (DESMARCHELIER *et al.*, 1999). A infusão da casca tem propriedades sedativas e também é usada contra gonorréia, diarreia e disenterias. É usada

também como cicatrizante nas contusões, cortes e ulcerações (MAIA, 2004). Na forma de xarope e chá, a resina e as folhas são utilizadas como depurativos do sangue (GONZALEZ; SILVA, 1987), sendo ainda recomendadas para reumatismo e bronquite (DESMARCHELIER *et al.*, 1999).

Quanto aos componentes químicos há a presença de terpenóides, flavonóides, iridóides, bezenóides, polifenóis e alcalóides (GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2004; MIYAUCHI; YOSHIMOTO; MINAMI, 1976). As sementes possuem alcalóides psicoativos, dentre os quais a bufotenina (5-OH-dimetiltriptamina), variando de 1 a 12% da massa das sementes e o N,N-dimetiltriptamina (N,NDMT) e 5-metoxi-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) (TORRES; REPKE, 2009). A goma-resina possui um heteropolissacarídeo, contém arabinose (67,8%), galactose (24,1%), ácido urônico (5,9%) e traços de ramnose, apresentando baixa viscosidade e sendo empregada no tratamento de problemas respiratórios (PAULA; BUDD; RODRIGUES, 1997; SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

3.1.2 *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão)

Espécie pertencente à família Leguminosae – Mimosoideae, nativa no bioma Cerrado, popularmente conhecida como barbatimão, barba-de-timan, barbatimão-verdadeiro, casca-da-mocidade entre outras. Possui como sinônimas científicas *Accacia adstringens* Mart.; *Stryphnodendron barbatiman* Mart.; *Stryphnodendron adstringens* Coville; *Mimosa barbatiman* Vell; *Mimosa virginalis* Arruda.

Arbusto regular ou árvore pequena, de caule e ramos tortuosos, revestidos de pouco folhagem. Casca rugosa, folhas bipinadas, 5 a 8 jugos, folíolos com 6 a 8 jugos, ovados, pequenos. Flores/inflorescências avermelhadas ou quase brancas, pequenas, dispostas em espigas cilíndricas, axilares, densas (Figura 2). Fruto vagem, séssil, grossa e carnosa, linear-oblonga, comprida, de 10 cm de comprimento. Sementes oblongas, pardacentas (GRANDI, 2014).

As partes mais usadas da planta são a casca do caule e os ramos, as mesmas são usadas em forma de tintura ou extrato fluido, infuso e decocto. Essas formas são empregadas popularmente contra diarreia, desinteria, escorbuto, hemorroidas, conjuntivite, adstringente, hemostático, cicatrizante e para limpeza de ferimentos (NUNES *et al.*, 2003; MACEDO; FERREIRA *et al.*, 2004). Segundo Toledo (2002) o extrato obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens* demonstra atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Além de outras atividades como tripanomicida (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002) e anti-inflamatória (FALCÃO *et al.*, 2005).



Figura 2: Folhas e Inflorescências do *Stryphnodredon adstringens*. Folhas bipinadas e inflorescências em espigas cilíndricas de *Stryphnodredon adstringens*.

Sua constituição química apresenta taninos de três espécies, sendo taninos condensados, substâncias monoméricas (flavan-3-óis) e proantocianidinas (entre elas 8 tipos de prodelfinidinas e 8 prorobinetinidinas), substâncias tânicas (20 a 30%), taninos (18 a 27%), alcaloides não determinados, amido, matérias resinosas, mucilaginosas, matéria corante vermelha, ácido tânico, estrifino, açúcar solúvel, flavonoide e flocafenos (GRANDI, 2014; SANTOS *et al.*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2001).

3.1.3 *Punica granatum* (Romã)

Espécie pertencente à família Lythraceae (antiga Punicaceae), com a sinonímia vulgar de romã. Arbusto ou árvore pequena, oriunda da África boreal e cultivada nas regiões quentes e temperadas do mundo inteiro. Suas ramificações transformam-se em espinhos pelo endurecimento dos ramos e quedas das folhas. Essas são simples, inteiras, fasciculadas em torno

dos nós, às vezes alternas, ou quase opostas, desprovidas de estípulas, brevemente pecioladas, ovais e coriáceas. Flores de cor vermelha-escarlate. Receptáculo côncavo, um pouco oblíquo. Os frutos compõem-se de uma baga globosa de casca coriácea, amarela ou avermelhada manchada de escuro, multilocular, com inúmeras sementes angulosas, cobertas por tegumento espesso, polposo, de sabor doce ligeiramente ácido. Reproduz-se por sementes e prefere terrenos úmidos e profundos (Figura 3) (GRANDI, 2014; GOMES, 2007).



Figura 3: Árvore de *Punica granatum*. Folhas, frutos e sementes de *Punica granatum*.

Da romeira as partes mais usadas são cascas do caule, da raiz ou do fruto, nas formas de infuso, decocto, tintura, ou extrato fluido. Utilizadas no tratamento de inflamações de garganta, rouquidão, nas hemorragias de ovário e útero, como vermífugo e tenífugo e para fortalecimento do couro cabeludo. As demais partes como frutos é utilizado o suco contra úlceras na boca e genitálias, alivia dores de ouvido, além de ser utilizado no tratamento de disenteria e ser benéfico contra a lepra. As flores são usadas no tratamento de gengivites e possuem atividade adstringente e hemostática. Os brotos das flores, secos e pulverizados, são usados para a bronquite (GRANDI, 2014; LANGLEY, 2000).

Em sua constituição química possui 28% do peso em taninos além de alcaloides: peletierina, isopeletierina, e pseudopeletierina, metil-peletierina; amido, ácido gálico, e granadotânico, manita, vitaminas B2, C e D, Magnésio e Ferro (GRANDI, 2014; NODA *et al.*, 2002).

3.1.4 *Plantago major* (Tansagem)

Pertencente à família Plantaginaceae, a tansagem ou transagem popularmente conhecida é uma planta herbácea, perene, polimorfa, com rizoma curto e oblongo. Folhas radicais pecioladas, ovais ou muitas vezes elípticas, inteiras ou sinuado-denteadas, estreitas no pecíolo (Figura 4). Inflorescência em espigas lineares, cilíndricas, alongadas, multifloras, com brácteas ovóides, obtusas, membranáceas, côncavas. Flores pálidas, pequeninas, numerosas. Fruto cápsula com muitas sementes, muitas vezes violáceas. Sementes pequenas, de 8 a 15 e de cor alivácea (GRANDI, 2014).



Figura 4: *Plantago major*. Folhas e Inflorescência de *Plantago major*.

Todas as partes da *Plantago major* L. são utilizadas em formas de infuso, decocto, tintura, extrato fluido ou emplastro. Tônico, febrífugo, adstringente, anti-inflamatório principalmente em dores de garganta, inflamações uterinas e nas doenças de pele, resolutivo e expectorante, mucilagem das folhas para proteção de mucosas inflamadas e das vias respiratórias entre outras aplicações (BLANCO *et al.*, 2008; GRANDI, 2014).

Apresenta mucilagem, glúcides, tanino, sais minerais e enxofre em sua composição química. Além de ácidos orgânicos: clorogênico e ursólico, ácido sílico, glicosídeos: alcubina, alcaloides: plantagonina e indicaína, resinas: alantoína; heterosídeos: alcubigenina; enzimas: emulsina e invertina, colina, vitamina C e sais de potássio (VENTURA *et al.*, 2016; GRANDI, 2014).

3.1.5 *Ocimum gratissimum* (Alfavaca)

Pertence à Família Lamiaceae e é vulgarmente conhecida como alfavacão, alfavaca e alfavaca-cravo, o nome alfavaca é dado a várias plantas do mesmo gênero, *Ocimum*, muito parecidas umas com as outras, mas a *Ocimum gratissimum* L. apresenta propriedades terapêuticas e apresenta aroma forte e agradável que lembra o cravo-da-índia (LORENZI; MATOS, 2008; CORRÊA, 1926)

Subarbusto aromático com até 2 m de altura, é originário do Oriente e subespontâneo em todo o Brasil. Raiz principal, folhas ovais-lanceoladas, com as bordas serradas de 4 a 8 cm de comprimento (Figura 5). Flores pequenas, lilases ou brancas, dispostas em inflorescência abundante e ereta, do tipo cacho de cima triflora. Fruto do tipo capsula, pequeno, formado por 4 sementes esféricas, muito apreciado por alguns pássaros. Muito cultivada em hortas a partir das sementes, adapta-se bem em qualquer tipo de solo. (GRANDI, 2014; LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 5: Subarbusto de *Ocimum gratissimum*. Folhas e inflorescência de *Ocimum gratissimum*.

Tem suas sumidades floridas, folhas e flores como sendo as partes usadas, em formas de infuso, decocto, xarope, sumo, maceração ou emplasto. Empregado para gripes,

resfriados, infecções do trato respiratório superior, febrífugo, expectorante, béquico, sudorífero, reumatismo, as folhas podem ser usadas como antisséptico bucal e contra frieiras (GRANDI, 2014; PATON, 1992; MATOS, 2000; EFFRAIM, 2001; LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS, 2008).

Toda a parte da planta contém o óleo essencial rico em eugenol (substância muito volátil que se perde com fervura demorada). A presença do eugenol confere à planta e a seu óleo essencial ação antisséptica local contra fungos (*Aspergillus* e *Trichocerma*) e bactérias (*Staphylococcus*). Possui ainda o óleo essencial (timol, estragol, metil-chavecol, linalol, cânfora), taninos e ácido rosmarínico. O óleo e o extrato (tintura) são também aromatizantes bucais (GRANDI, 2014; PARNHAM; KESSELRING, 1985; PETERSENA; SIMMONDSB 2003).

3.2 Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas de proteínas e com esse processo há a liberação de peptídeos de tamanhos variáveis ou de aminoácidos livres. São encontradas distribuídas em diversos organismos, como plantas, animais e microrganismos e devido sua variada especificidade possuem uma classificação complexa, podendo ser classificadas com base em seu sítio ativo, devido aos resíduos catalíticos de interação entre a protease e seus inibidores específicos, em cinco subclasses: serinoproteases (SPs), metaloproteases (MPs), aspárticoproteases (APs), cisteínoproteases (CPs) e treoninoproteases (TPs) (LÓPEZ, 2010; DUARTE, 2008).

Além dessa, podem ser classificadas de acordo com sua posição de clivagem das ligações peptídicas como exopeptidases que atuam sobre as extremidades das cadeias polipeptídicas, as enzimas que agem sobre a extremidade N- ou C-terminal são conhecidas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente e diferenciam-se pela especificidade de substrato; assim como classificada de acordo com seu mecanismo catalítico em endopeptidases que operam em regiões internas das cadeias polipeptídicas, longe das extremidades (GONZÁLEZ-RÁBADE *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 1998).

As enzimas proteolíticas apresentam ampla distribuição filogenética e, além de exercerem a função de quebra de proteínas, estão intimamente ligadas a vários processos fisiológicos essenciais nas células e nos tecidos como: coagulação sanguínea, cicatrização,

fertilização, diferenciação e crescimento celular, sinalização celular, resposta imune, apoptose, ativação de zimogênios, liberação de hormônios a partir de precursores, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, translocação através de membranas, digestão intra e extracelular, entre outros; através de proteólise limitada (NAKAHIRA, 2004; SAFAVI; ROSTAMI, 2012).

Além da sua relevância fisiológica, as proteases têm potencial nocivo para o ambiente proteico de uma célula ou de um organismo; uma vez que a hidrólise de uma ligação peptídica é um evento irreversível, se torna necessário um rígido controle, pois as mesmas descontroladas podem acarretar vários estados patológicos como: enfisema pulmonar, epilepsia, doenças hepáticas, cânceres, doenças reumáticas, doenças degenerativas, doenças autoimunes, inflamação, angiogênese patológica e crescimento tumoral ou metástase dentre outras (BERG, 2008; HEAL *et al.*, 2008; KUESTER *et al.*, 2008; LOSSO, 2008).

Diante disso, ao realizar a clivagem das ligações peptídicas, as proteases podem influenciar nas perdas, ganhos, ou interrupções de funções dependendo da origem de seus substratos, por isso a importância de se manter a atividade das proteases controlada e regulada adequadamente (ZANI; MOREAU, 2010). Existem vários níveis de controle para que esse processo ocorra de forma correta, incluindo a regulação da transcrição gênica, a ativação das pró-formas de protease e a inibição de sua atividade proteolítica por meio do bloqueio direto ou indireto de seus centros ativos por inibidores de proteases. Acredita-se que a forma mais relevante de controle em células e tecidos sejam os inibidores de proteases, devido sua alta concentração em todos os fluidos biológicos (ZANI; MOREAU, 2010).

3.3 Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases estão presentes em todos os tipos de organismos e microrganismos, tecidos vegetais e animais. Nas plantas são encontrados principalmente nas famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae (HAMMOND *et al.*, 1984; BAEK *et al.*, 1994) e são compostos que possuem a capacidade de diminuir a atividade de uma enzima. O interesse em estudar as funções fisiológicas desses inibidores se dá devido a sua importância na regulação de diferentes processos em que as proteases estão envolvidas, desde a quebra de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, invasão celular, apoptose, entre outras (FEDATTO, 2004).

Os inibidores de proteases são agrupados com base em seus mecanismos de reação, origem ou similaridades estruturais e podem ser enquadrados em três grupos diferentes, levando em consideração suas especificidades, sendo: inibidores que reagem com mais de uma classe de proteases, os que são específicos para uma das classes e aqueles que apresentam alta especificidade para uma única protease (PERONA; CRAIK, 1995 apud TREMACOLDI, 2009).

Tendo a estrutura como parâmetro, os inibidores de proteases podem ser classificados em grupos, sendo o grupo dos que apresentam baixo peso molecular e o grupo dos inibidores peptídicos com uma ou mais cadeias polipeptídicas. Existe ainda a classificação dos inibidores de acordo com o tipo de protease que inibem, sendo: inibidores de serino, aspártico, treonino, cisteíno e metaloproteases (POWERS *et al.*, 2002).

Dentre as várias classes de proteases destacam-se: os inibidores de tripsina do tipo Kunitz, e os inibidores de Bowman-Birk (BBI) (RYAN, 1990). A tripsina hidrolisa ligações peptídicas na extremidade carboxila de L-aminoácidos básicos, como a arginina (Arg) e a lisina (Lys), enquanto a quimotripsina catalisa a hidrólise de ligações após resíduos de leucina (Leu), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr). Assim, muitos peptídeos naturais inibidores de tripsina possuem uma arginina ou lisina, que se ligam ao sítio ativo da enzima, localizado na imediação da tríade catalítica responsável pela catálise (BERTRAND *et al.*, 1996).

A inibição das proteases por inibidores proteicos ocorre por ligação específica que está restrita ao sítio reativo (THEODORO JÚNIOR, 2014), assim existem dois mecanismos gerais e distintos de inibição enzimáticos representados pela inibição irreversível e pela inibição reversível de forte ligação. Na inibição enzimática irreversível, ocorre a modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou mesmo no sítio catalítico da enzima, ou seja, a ligação entre a enzima e o inibidor torna a recuperação da atividade enzimática impossível (BODE; HUBER, 2000).

Esses inibidores proteicos têm o sítio ativo convertido em uma forma modificada na qual um peptídeo é clivado, e passa a corresponder ao substrato de especificidade primária do substrato da protease (BODE; HUBER, 1992). O acesso do substrato à região catalítica da enzima e a complementaridade estrutural dessas moléculas são condições determinantes para a ocorrência do processo de proteólise e a consequente eficiência da interação enzima-substrato (LIU *et al.*, 2006; PERONA *et al.*, 1995).

Os demais inibidores de ocorrência natural utilizam o mecanismo da inibição reversível de forte ligação, pois interagem com grande afinidade ao sítio ativo da protease de

modo semelhante ao da ligação enzima-substrato. Este inibidor pode ser clivado ou não durante o processo de inibição, e ser liberado do sítio ativo da enzima não modificado ou íntegro, mecanismo este que tem sido demonstrado conclusivamente apenas para as proteases, enzimas essas que apresentam massas moleculares que variam entre 19 e 110 kDa, além de apresentarem atividade ótima em pH alcalino e temperatura fisiológica (ANTÃO; MALCATA, 2005). Considerando esse padrão de inibição, estudos já reconheceram 19 famílias de inibidores (LASKOWSKI; QASIM, 2000).

Estudos epidemiológicos correlacionam o consumo de alimentos ricos em inibidores de proteases à redução da incidência de diversos tipos de doenças, inclusive cânceres (KELLOFF *et al.*, 2000). Diante disso, existem vários inibidores de proteases que fazem parte da dieta humana e que possuem a capacidade de inibir enzimas quimotripsina-símbles. A soja (*Glycine max*) é um exemplo de leguminosa rica em compostos com reconhecida ação anticarcinogênica, incluindo ácido fítico, saponinas, isoflavonóides e inibidores de proteases, os quais representam aproximadamente 6% do total de proteínas encontradas em sua composição (MESSINA; BARNES, 1991). Dentre os inibidores de proteases, encontram-se os inibidores de tripsina do tipo Kunitz (KTI) e os inibidores Bowman-Birk (LOSSO, 2008).

3.3.1 Inibidores de proteases do tipo Kunitz

Os inibidores de proteases tipo Kunitz (KTI), foram isolados primeiramente em soja (*Glycine max*), mas desempenham atividade inibitória sobre várias enzimas proteolíticas, como as proteases, tripsina, quimotripsina e subtilisina, os KTI são encontrados em inúmeras subfamílias de leguminosas, como: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae principalmente nas sementes (RICHARDSON, 1997). São mais ativos contra serinoproteases (GOMES *et al.*, 2005; HEIBGES *et al.*, 2003), mas podem inibir catépsina D e amilases de insetos e plantas (RITONJA *et al.*, 1990; RODENBURG *et al.*, 1995).

Os KTI encontrados na soja foram isolados e caracterizados por Kunitz em 1947. Os inibidores desse tipo apresentam uma composição de aproximadamente 181 resíduos de aminoácidos, uma massa molecular de aproximadamente 21-22 kDa além de serem formados por uma ou duas cadeias polipeptídicas e, em geral, apresentam quatro resíduos de cisteínas, que formam duas pontes dissulfeto (Cys39- Cys86 e Cys136-Cys145). A estrutura desse

inibidor demonstrou ausência de alfa-hélices, sendo formado assim principalmente por folhas-beta e estruturas desordenadas (SONG; SUH, 1998; LOPES, 2006; RIBEIRO, 2009).

Estudos sobre o sítio reativo dos inibidores de tripsina tipo Kunitz da soja demonstraram que os aminoácidos, Arg63 ou Lys63 (P1) e Ile64 (P1'), são essenciais para a atividade desses inibidores (KOWALSKI; LASKOWSKI, 1976; RYAN, 1981). Os KTI interagem com a enzima por meio dos resíduos de aminoácidos Arg ou Lys os quais são complementares ao sítio catalítico S1, composto por resíduos que caracterizam a especificidade do inibidor. Devido essa interação direta do resíduo do sítio reativo do inibidor com o sítio catalítico da enzima indica um mecanismo de inibição competitivo, habitual para inibidores de tripsina da família Kunitz (BODE; HUBER, 2000; FRANCO *et al.*, 2002).

3.3.2 Inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk

Os inibidores da família Bowman-Birk (BBI) são inibidores proteicos de proteases, isolados pela primeira vez em sementes de soja por Bowman, em 1946, e caracterizados por Birk e colaboradores em 1963, sendo posteriormente identificados em outras espécies de leguminosas e gramíneas (CLEMENTE *et al.*, 2011). Os BBIs encontrados na soja são pequenas proteínas possuidoras de baixo peso molecular e composta por 71 aminoácidos e sete pontes dissulfeto que possibilitam a formação de uma estrutura assimétrica com dois sítios reativos independentes capazes de inibir, de forma reversível, as enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina - inibidores de dupla-cabeça (TOUIL *et al.*, 2008; DESHIMARU *et al.*, 2004; LOSSO, 2008).

A atividade pode ser eficientemente inibida pelo BBI devido a interação do BBI com a tripsina e/ou com a quimotripsina. Fato associado a estrutura do seu sítio reativo tido como *loop*, ou também conhecido como “dupla-cabeça”, que é totalmente complementar ao sítio ativo da proteína a ser inibida, proporcionando assim uma ligação forte do inibidor com a protease (CHEN *et al.*, 1992).

Essa ligação é do tipo reversível e possui elevada afinidade, até mesmo comparada à afinidade dos substratos proteicos. O encaixe apropriado nos sítios enzimáticos impossibilita as mudanças na forma fundamentais à catálise, acordando um complexo típico enzima-inibidor com um bloqueio energético adverso à hidrólise (READ, 1986).

Estudos mostram que as duas enzimas (tripsina e quimotripsina) podem ser simultaneamente inibidas pelo BBI em sua forma monomérica. Acredita-se que ocorra uma

pequena mudança conformacional no inibidor com o objetivo de adequar as duas enzimas, existindo assim um comportamento cooperativo nessas ligações (PRAKASH *et al.*, 1997). Além disso, Jensen e seus colaboradores (1996) atestam que após a formação do complexo, o BBI é clivado muito lentamente.

Segundo Ferreira (2013), os BBIs possuem diferentes especificidades, isso devido à versatilidade de aminoácidos presentes em seu sítio ativo, tornando-se assim moléculas com potencial para inibir outras serinoproteases, diferentes da tripsina e quimotripsina, que possuem envolvimento na regulação de sistemas fisiológicos de organismos superiores, como a catepsina G, elastase e cimase.

O BBI é solúvel em água, resistente ao calor, à força iônica e ao pH em condições ácidas (BIRK, 1985 apud SAFAVI; ROSTAMI, 2012). Possui uma estrutura pequena, com ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto, o que lhe possibilita uma maior estabilidade capaz de garantir sua atividade mesmo quando se encontra em condições desfavoráveis (OLIVEIRA, 2004). O BBI possui uma característica estrutural diferenciada que é a ausência de uma “cavidade hidrofóbica”, característica marcante em proteínas globulares que possibilita arranjo e estabilidade dessas moléculas (FERREIRA, 2013).

Dentre as famílias conhecidas de inibidores de proteases, a família Bowman-Birk pode ser considerada a mais privilegiada em estudos, pois são facilmente encontradas em plantas da família Fabaceae (NORIOKA; IKENAKA, 1983) e Poaceae (ODANI *et al.*, 1986). Ao contrário do que se acreditava, estudos com milho, alfafa e arroz comprovam que além de estarem presentes nas sementes, os inibidores de proteases Bowman-Birk podem ser encontrados em folhas e caules submetidos a algum tipo de injúria (ROHRMEIER; LEHLE, 1993; MCGURL *et al.*, 1995; RAKWAL *et al.*, 2001).

Com o avanço da tecnologia e das pesquisas voltadas para descoberta de novas drogas para o tratamento de enfermidades, os fitofármacos a base de moléculas com ação terapêutica de origem vegetal, como os inibidores de proteases, é uma alternativa viável ecologicamente e economicamente levando-se em consideração o elevado custo para o desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos e seus efeitos muitas vezes indesejáveis tais como a própria dificuldade de adaptação ao receptor biológico (LASTRES *et al.*, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e Purificação dos inibidores de proteases

4.1.1 Obtenção do extrato enriquecido das espécies vegetais

Os materiais referentes as espécies foram selecionadas no campo de acordo com a necessidade no período de janeiro a novembro de 2015. As folhas do *Anadenanthera colubrina* (registro nº HDJF 3355) foram coletadas em uma árvore no Sítio Candonga no município de Araçuaí, as folhas e as inflorescências do *Stryphnodendron adstringens* (registro nº HDJF 3356) foram coletados em árvore na Chapada entre a cidade de Araçuaí e o distrito Lufa, as folhas e inflorescências da *Ocimum gratissimum* L. foram adquiridas em um arbusto na cidade de Teófilo Otoni, as folhas de *Plantago major* L. e *Punica granatum* L., assim como as sementes de *Punica granatum* L. foram coletadas no quintal de uma residência no município de Araçuaí, por vez a soja grão (*Glycine max*) foi adquirida no comércio local da cidade de Teófilo Otoni. Os números de registro apresentados para as espécies de *Anadenanthera colubrina* e *Stryphnodendron adstringens* foram adquiridos no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) do Departamento de Engenharia Florestal – Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus Juscelino Kubitschek (JK), ao qual possui as mesmas incorporadas ao seu acervo.

O processo de extração ocorreu nessas partes específicas das espécies vegetais (folhas, inflorescência e sementes) devido serem utilizadas popularmente.

A extração proteica na *Glycine max* grão foi realizada como medida padrão de comparação para inibidores de proteases, seguindo a metodologia proposta por Yavelow e seus colaboradores (1985), adaptada para as espécies vegetais.

Para se obter as melhores condições para extração proteica, as folhas, inflorescências e sementes, foram moídas cruas e separadamente em liquidificador para conseguir um extrato rico em inibidores de proteases. Para cada preparação foram utilizados 100g de material vegetal.

As proteínas foram extraídas acrescentando-se 10% p/v em etanol a 60% por 1 h à 55 °C com agitação constante e, em seguida, resfriado rapidamente em banho de gelo e disposto em repouso por 24 horas. O material oriundo desse tratamento foi submetido à centrifugação a 6.500 x g, por 30 min a 4°C para remoção de fibras insolúveis presentes.

Após o período de extração, a mistura foi filtrada em gaze, e acidificada com HCl até pH 5,3. Procedeu-se a precipitação do extrato bruto, com a adição de volumes crescentes de Acetona P.A. a -20°C.

O material foi mantido em banho de gelo durante todo o processo de extração. O extrato enriquecido obtido foi submetido à centrifugação a 6.500 x g por 30 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 5 mL de água destilada e armazenou-o à -80 °C para posterior análise.

4.2 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) na adsorção do reagente *Coomassie Brilliant Blue* G-250, utilizando soro albumina bovina (BSA), em soluções de 20 a 100 µg/mL para obtenção da curva padrão, como padrão analítico na concentração de 1 mg/mL. A leitura de quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro (AJX-6100PC Espectrofotômetro Duplo Feixe, MICRONAL) no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm). Os dados foram gerados pelo *software* UV-Vis Analyst e analisados pelo programa Excel.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS: Detecção dos inibidores de proteases por eletroforese

As amostras dos extratos proteicos provenientes dos procedimentos de purificação dos inibidores de proteases foram submetidas a detecção e identificação por eletroforese em gel de poliacrilamida no sistema descontínuo, sendo os suportes eletroforéticos géis de poliacrilamida de separação a 12% e de concentração 5%, preparados em condições desnaturantes (SDS), segundo método de Laemmli (1970).

Os géis foram preparados misturando: solução tampão Tris 1,5M pH 8,8 no gel de separação e solução Tris 0,5M pH 6,6 no gel de concentração; solução de acrilamida 30% p/v + bis-acrilamida 1% p/v; solução de SDS a 20% p/v; solução de persulfato de amônio a 10% (preparo recente); N,N,N',N' - Tetrametil-etilenodiamina (TEMED); água destilada q.s.p.

As amostras para aplicação no gel foram preparadas na concentração de 50 mg/mL de proteína (por poço) na fração de 2:1, sendo 20 µl de tampão da amostra de Tris 1M pH 6,8;

SDS 20% p/v, glicerol 20% v/v, EDTA 0,5M, azul de bromofenol 0,1% p/v, β -mercaptoetanol e água destilada q.s.p. e submetidas ao banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação total das proteínas. O padrão de peso molecular utilizado foi o *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, de massas moleculares de 10 a 250 kDa da *Thermo Scientific*. O extrato proteico a base de *Glycine max* grão foi utilizado como padrão de comparação para detecção da presença de bandas de inibidores de proteases.

O tampão Tris-HCl 25 mM contendo glicina 0,19 M e SDS 0,1% p/v foi utilizado como tampão de corrida. A eletroforese foi realizada sob uma corrente elétrica constante de 120 Volts por gel, durante aproximadamente 180 minutos. Após o termino da eletroforese, a presença das bandas proteicas foi detectada com a imersão dos géis em solução de *Coomassie Blue R-250* 0,025% em metanol 25% e 5% de ácido acético sob agitação branda por 2 horas. Em seguida os géis foram descorados em solução 40% metanol e 10% ácido acético até a visualização plena das bandas.

4.4 Varredura do comprimento de onda

Os sobrenadantes dos extratos proteicos foram submetidos a variadas diluições em água destilada para realização de uma varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro (UV-Vis Cary 50, Varian) para identificação da melhor absorção. Os dados foram gerados pelo *software* Scan versão 3.0 e analisados pelo programa Origin 8.

4.5 Purificação de inibidores de proteases por cromatografia líquida de alta eficiência

As diluições das amostras sujeitadas a varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência para análise de pureza. A cromatografia foi realizada em coluna LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) (Supelcosil, Sigma-Aldrich), em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) modelo ProStar (Varian) utilizando o *software* Galaxie e os dados foram analisados no programa Origin 8.

A coluna foi previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água (H₂O) (solvente A) e eluída em um gradiente de 0 a 100% do solvente acetonitrila (ACN) + TFA 0,08% (solvente B), sob um fluxo de 0,8 mL/min durante 45 minutos. A eluição foi monitorada entre 190 e 300 nm.

Após a coluna ter sido equilibrada as amostras diluídas e filtradas foram submetidas a corrida no HPLC com a injeção de 20 µL sob a condição cromatográfica para análise da pureza com a Fase móvel de A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%; eluição por gradiente: 0 a 100% de B em 45 minutos.

4.6 Distribuição do tamanho e potencial Zeta dos inibidores de proteases

As amostras para determinação da distribuição do tamanho e do potencial Zeta dos inibidores de proteases foram preparadas a partir do sobrenadante do extrato enriquecido das espécies vegetais em água destilada nas diluições de 5 e 10 vezes, por meio de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano – ZS (Malvern) e o *software* Zetasizer. O instrumento opera com laser de He-Ne, $\lambda = 633$ nm e a detecção é feita em um único ângulo de 173° a 25 °C. As medidas do potencial Zeta (ζ) médio das partículas foram realizadas também a temperatura de 25 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies selecionadas foram: *Anadenanthera colubrina* (angico), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), *Punica granatum* (romã), *Plantago major* (tansagem) e a *Ocimum gratissimum* (alfavaca) e submetidas ao Genbank. Essas, foram escolhidas devido ao uso semelhante para o tratamento de inflamações.

5.1 Submissão ao GenBank

As cinco espécies escolhidas foram submetidas ao GenBank e não tiveram suas sequências dos inibidores de proteases descritas no banco de dados, ao contrário da *Glycine max*, espécie vegetal utilizada como padrão de comparação para inibidores de proteases.

As espécies vegetais escolhidas para desenvolver o estudo não apresentam relação de gênero ou espécie. Assim, foram submetidas a uma pesquisa no GenBank utilizado para facilitar a identificação de sequências genéticas. No GenBank buscou-se identificar a presença de sequências de inibidores de proteases presentes nessas espécies, conforme Migliolo (2008) que usou a busca no banco de dados do gene para encontrar a sequência de inibidores de proteases em *Adenanthera pavonina* e José (2002) que por meio do GenBank extraiu informações para sequências de inibidores de proteases da *Glycine max*, com a finalidade de determinar as relações de ancestralidade desses inibidores.

Diante disso, a busca no GenBank da presença de sequência de inibidores de proteases nas espécies selecionadas foi realizada, mas as mesmas não foram detectadas, o que não inviabiliza o estudo, pois o fato de não ter encontrado a sequência de inibidores de proteases pode estar relacionado em as mesmas não terem sido estudadas até o momento e por isso não estarem depositadas no banco de dados.

5.2 Isolamento e Purificação dos inibidores de proteases

5.2.1 Quantificação de proteínas dos extratos enriquecidos

A extração proteica dos inibidores de proteases foi realizada nas folhas de *Punica granatum*, *Plantago major*, *Ocimum gratissimum*, *Anadenanthera colubrina* e *Stryphnodendron adstringens*, nas inflorescências de *Ocimum gratissimum* e *Stryphnodendron adstringens*, nas sementes de *Punica granatum*, e nos grãos de *Glycine max*.

A metodologia para extração proteica foi a proposta por Yavelow e seus colaboradores (1985), que é utilizada para isolamento e purificação de inibidores de proteases de sementes de leguminosas, e foi empregada pela primeira vez nessas espécies vegetais, principalmente em folhas e inflorescências.

Para evidenciar o resultado satisfatório do método de extração de inibidores de proteases, os extratos enriquecidos obtidos foram submetidos a uma análise de quantificação proteica onde alguns tiveram uma concentração de inibidores de proteases semelhante e até maior que a encontrada nos grãos de *G. max* padrão ouro, sugerindo a eficácia da metodologia ao ser aplicada para extração em espécies e partes completamente diferentes.

O Gráfico 1 (A-F) mostra a representação da quantificação de inibidores de proteases dos extratos de *Punica granatum*, *Plantago major*, *Ocimum gratissimum*, *Stryphnodendron adstringens* e de *Anadenanthera colubrina* a base de folhas comparada ao extrato a base de *Glycine max* grão utilizada como padrão de comparação.

O Gráfico 2 (A-C), demonstra a quantificação de inibidores de proteases em extratos enriquecidos a base de sementes de *Punica granatum* e a base de inflorescências de *Stryphnodendron adstringens* e *Ocimum gratissimum* em comparação com extrato a base de *Glycine max* grão.

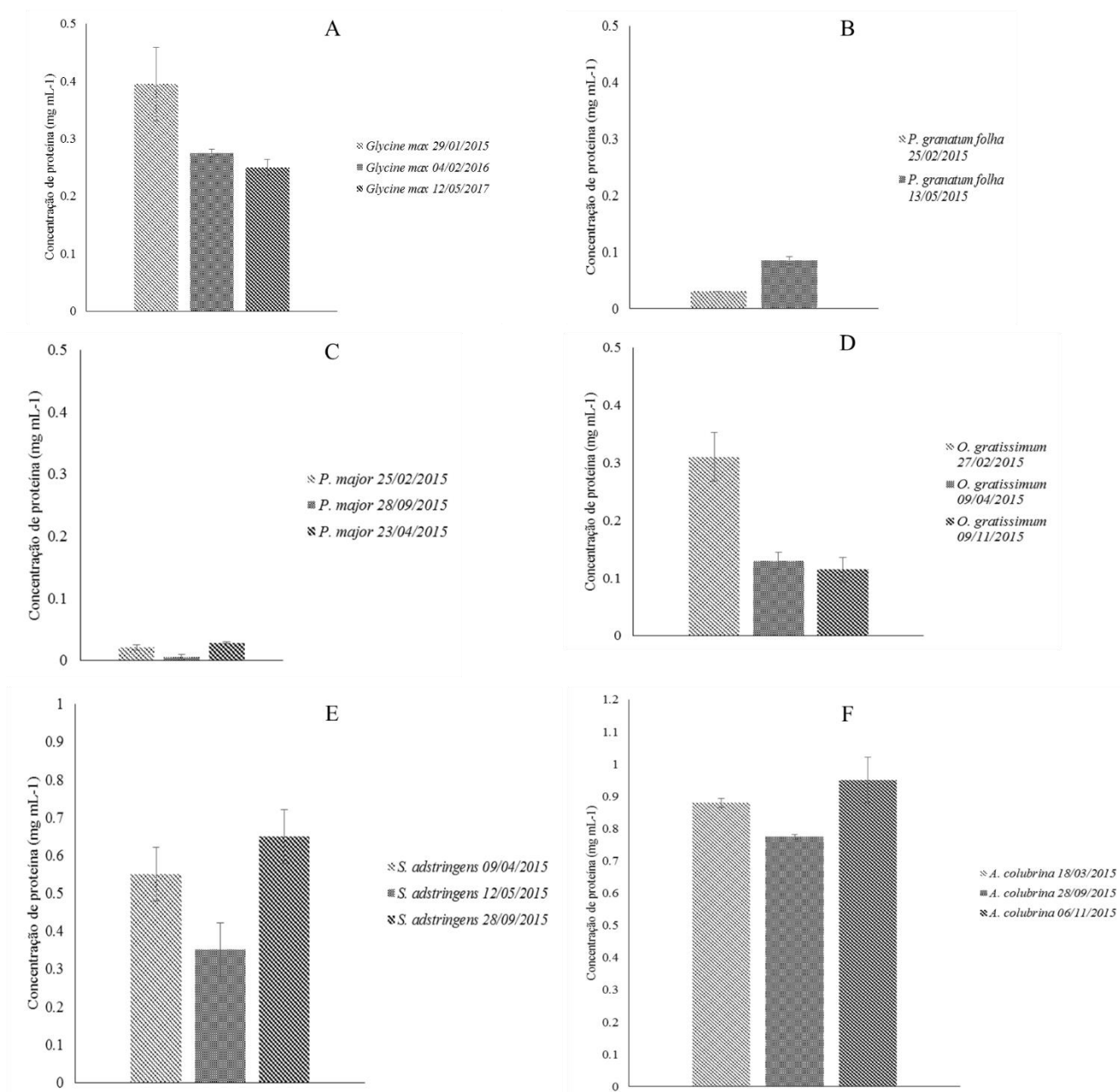


Gráfico 1: Quantificação de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos das folhas das espécies selecionadas e do padrão de soja. Os extratos enriquecidos de *Punica granatum*, *Plantago major*, *Ocimum gratissimum*, *Stryphnodendron adstringens*, *Anadenanthera colubrina* e da *Glycine max* grão, obtidos de extrações em diferentes datas foram detectadas pelo método de Bradford (1976) a uma absorbância de 595 nm. Barras = média ± desv. pad.

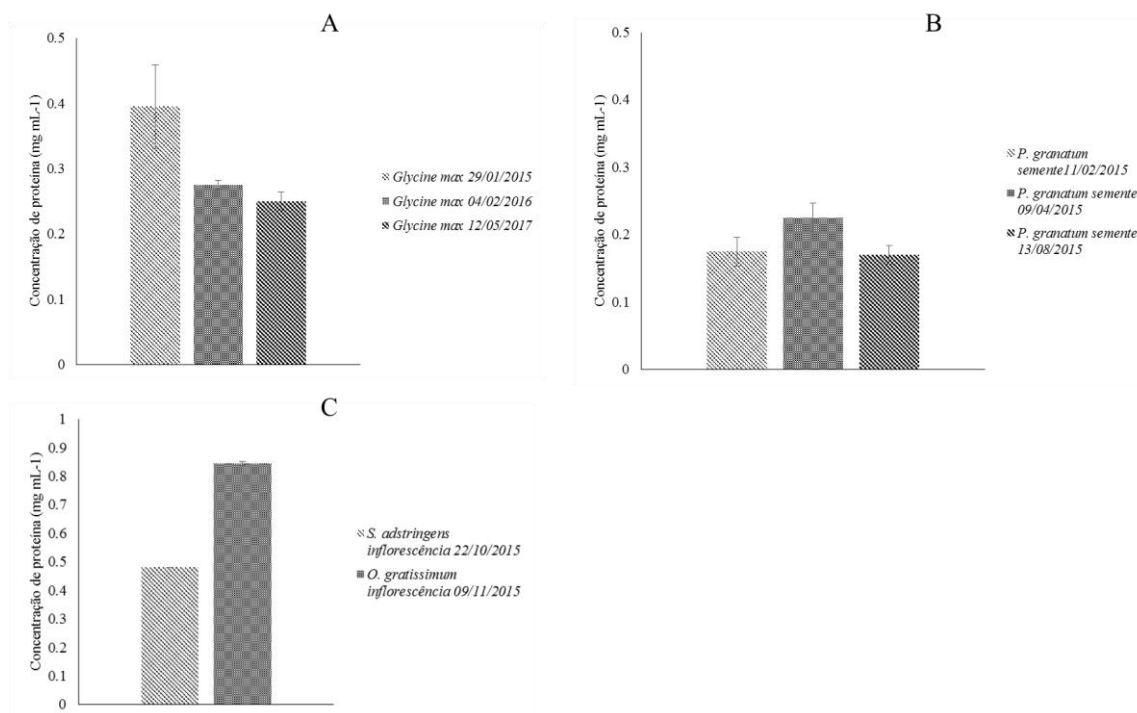


Gráfico 2: Quantificação de inibidores de proteases dos extratos enriquecido de sementes e inflorescências e do padrão de soja. Os extratos enriquecidos de sementes de *Punica granatum* e inflorescências de *Ocimum gratissimum* e *Stryphnodendron adstringens* e a base de *Glycine max* grão, obtidos de extrações em diferentes datas foram detectadas pelo método de Bradford (1976) a uma absorbância de 595 nm. Barras= média±desv.pad.

5.3 Detecção de inibidores de proteases por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE

Tendo como base os dados da quantificação de inibidores de proteases presentes nos extratos enriquecidos, os mesmos foram submetidos a detecção desses inibidores em gel de poliacrilamida. O perfil eletroforético do extrato de folhas de *Anadenanthera colubrina* demonstrou a presença de inibidores de protease com bandas nas alturas de 14, 17, 27, 30 e 37 kDa aproximadamente. Além da presença de bandas visíveis no extrato a base de *Glycine max* grão, utilizado como padrão de comparação, nas alturas de 14, 17, 30 e 53 kDa aproximadamente (Figura 6).

A metodologia empregada para purificação de inibidores de proteases, considerando a pureza do extrato, foi relativamente eficiente no extrato a base de folhas de *A. colubrina*, assim como para o extrato a base de *G. max* grão, devido ser possível verificar nessa preparação a presença de bandas em 14 e 17 kDa, assim como as aparentes no extrato de folhas de *A. colubrina* e demais bandas com massas moleculares de proteínas em 30 e 53 kDa.

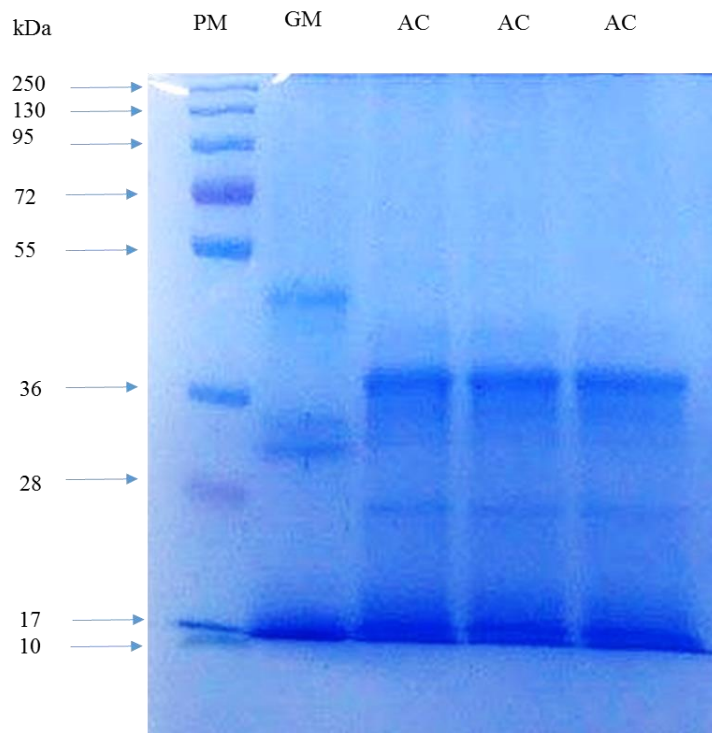


Figura 6: Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de folhas de *Anadenanthera colubrina* obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Legenda: PM: Peso Molecular de 10 a 250kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). AC: extrato a base de folhas de *A. colubrina*. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

A banda demonstrada na altura de 14 kDa, no perfil eletroforético do extrato a base de folhas de *A. colubrina*, pode estar relacionando como estudos já têm demonstrado, ao peso molecular dos inibidores de tripsina e Bowman-Birk (BBI) em espécies de *Vigna* como sendo de 10-16 kDa (KUMAR *et. al.*, 2013; SAMMOUR, 2006), podendo assim, essa banda representar a forma do dímero do inibidor, comportamento recorrente em inibidores BBI encontrado em várias leguminosas (BERGERON; NIELSEN, 1993; FIELDS *et al.*, 2012).

Já a *Glycine max* possui ampla distribuição de inibidores de proteases em suas sementes, além da lectina que apresenta massa molecular em torno de 30 kDa (SHARON; LIS, 1990). As mesmas são resistentes ao tratamento térmico empregado para extração de inibidores de proteases, não sendo a temperatura de aquecimento suficiente para desnaturá-las o que torna sua presença esperada no gel de poliacrilamida (LEAL, 2010).

O extrato enriquecido a base de sementes de *Punica granatum* demonstrou no gel a presença de apenas uma banda de inibidor de proteases na altura de 14 kDa. A mesma banda de inibidor em aproximadamente 14 kDa foi encontrada no extrato a base de *Glycine max* grão, utilizado como padrão de comparação, além da detecção de outras bandas nas alturas de 17, 21 e 30 kDa aproximadamente (Figura 7).

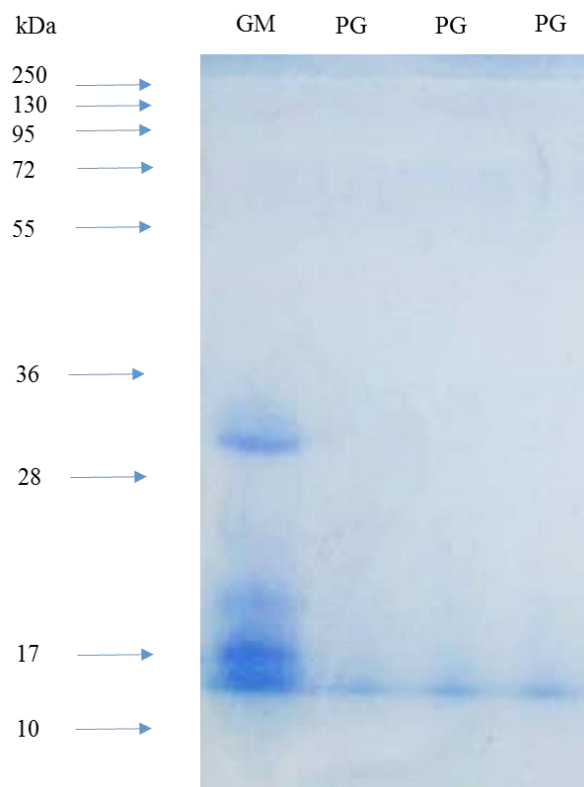


Figura 7: Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de sementes de *Punica granatum* obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Legenda: PM: Peso Molecular de 10 a 250 kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). PG: extrato a base de sementes de *P. granatum*. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

O mesmo comportamento foi observado no perfil eletroforético do extrato enriquecido de *Punica granatum*, que apresentou apenas uma banda na altura de 14 kDa, podendo ser representativa do dímero do BBI (KUMAR *et. al.*, 2013; SAMMOUR, 2006). Sendo constatada que a metodologia empregada foi eficiente para purificação de inibidor de proteases para o extrato a base de sementes de *P. granatum*.

A Figura 8 apresenta o perfil eletroforético dos extratos enriquecidos oriundos da *Ocimum gratissimum*, a base das inflorescências e folhas, o gel demonstra a presença apenas de uma banda na altura de 30 kDa aproximadamente, no extrato a base das inflorescências. O extrato a base *G. max* grão, padrão de inibidores de proteases, evidenciou a presença de bandas visíveis em 10, 17 e 30 kDa aproximadamente.

A banda na altura de 30 kDa aproximadamente, no extrato a base das inflorescências de *O. gratissimum*, assim como no extrato de grãos de *G. max*, certamente é específica da lectina que apresenta massa molecular em torno de 30 kDa em sementes de leguminosas (SHARON; LIS, 1990).

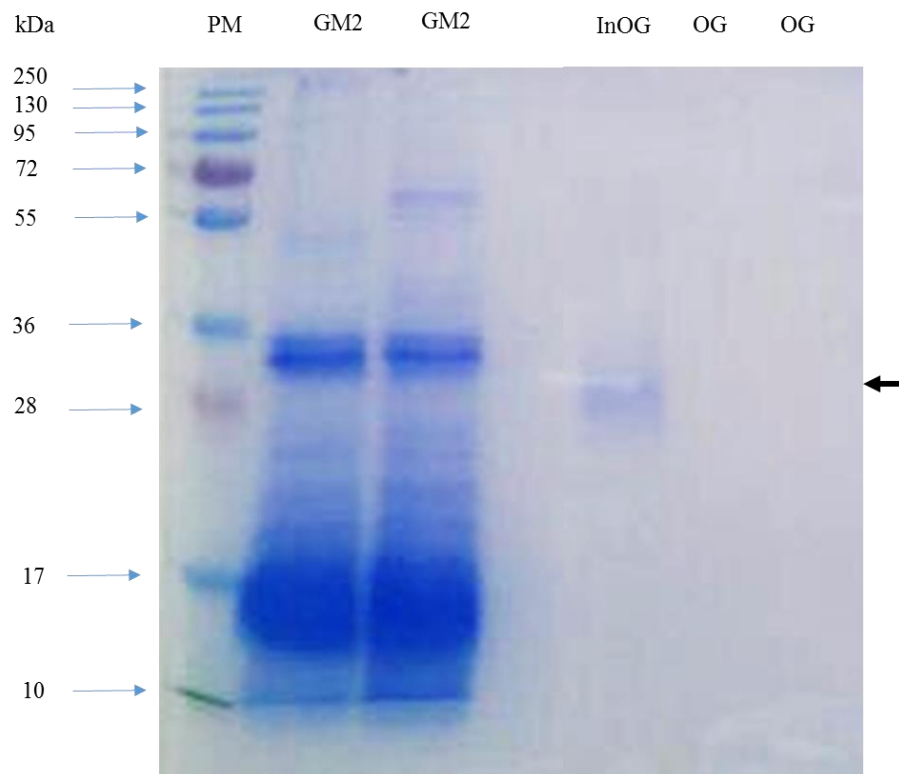


Figura 8: Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos enriquecidos a base de folhas e inflorescências de *Ocimum gratissimum* obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Legenda: PM: Peso Molecular de 10 a 250 kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). InGO: extrato a base de inflorescência de *O. gratissimum*. OG: extrato a base de folhas de *O. gratissimum*. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue* R-250. Seta=aproximadamente 30 kDa.

A desnaturação das proteínas e consequente perda da atividade enzimática, pode justificar a ausência de bandas de inibidores de proteases nos demais poços do gel, visto que a sua concentração era representativa para as inflorescências e relativamente representativa para o extrato a base de folhas. O resultado atribuído a concentração de proteínas considerável pode ser atribuída a substâncias como os taninos e ácido rosmarínico comumente presente na planta (GRANDI, 2014; PARNHAM; KESSELRING, 1985; PETERSENA; SIMMONDSB 2003).

Nos extratos enriquecidos obtidos das folhas de *Punica granatum* e a base das folhas de *Plantago major* por meio do gel não foram encontradas nenhuma banda característica de inibidores de proteases, assim como no extrato a base de inflorescência de *Stryphnodendron adstringens*, porém no extrato a de base folhas foi detectada uma leve banda (borrão) na altura de 250 kDa. O extrato a base *Glycine max* grão, padrão de inibidores de proteases, demonstrou a presença de bandas visíveis em 10, 17 e 30 kDa aproximadamente (Figura 9).

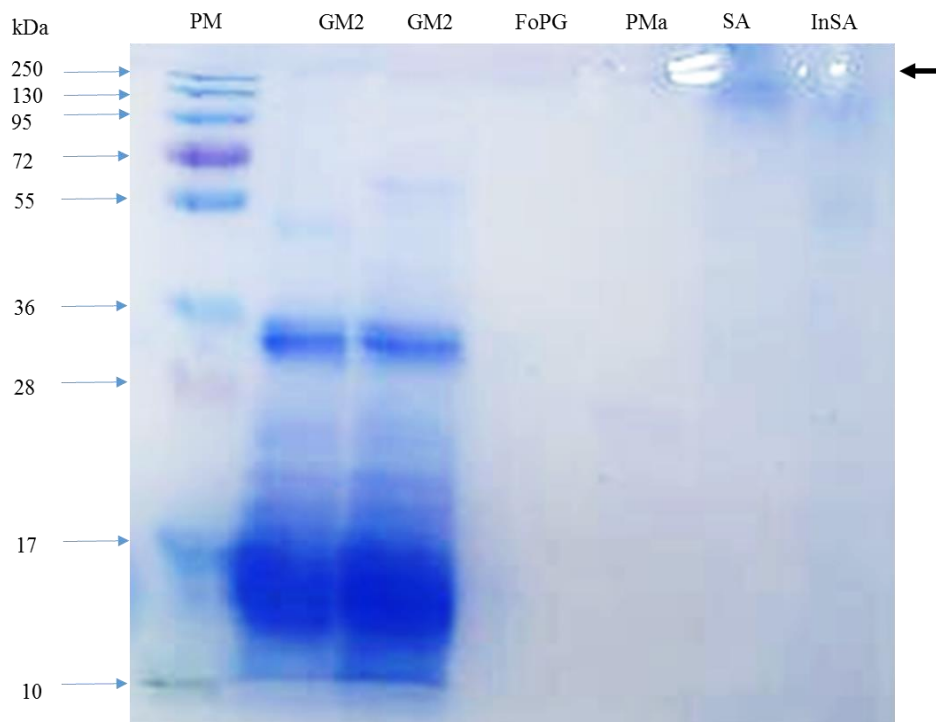


Figura 9: Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos enriquecidos sem bandas de inibidores de proteases obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). PM: Peso Molecular de 10 a 250 kDa, GM2: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). FoPG: extrato a base de folhas de *P. granatum*. PMa: extrato a base de folhas *P. major*. SA: extrato a base de folhas de *S. adstringens*. InSA: extrato a base de inflorescência de *S. adstringens*. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com Coomassie Blue R-250. Seta=aproximadamente 250 kDa.

A quantificação proteica dos extratos enriquecidos a base de folhas das espécies de *Punica granatum* e de *Plantago major* identificavam uma baixa concentração de inibidores de proteases em ambos os extratos enriquecidos, podendo os mesmos por essa razão não terem sido detectados no perfil eletroforético.

Quanto aos extratos de folhas e inflorescências de *Stryphnodendron adstringens*, os mesmos demonstraram uma concentração de inibidores consideravelmente elevada, possivelmente não sendo detectados no perfil eletroforético por terem desnaturado, característica apresentada pelo borrão na altura de aproximadamente 250 kDa, visto que as proteínas perderam sua atividade enzimática e permanecem no gel de empilhamento, não sendo aparentes no gel de corrida.

Ou ainda, os resultados obtidos com a quantificação proteica dos extratos oriundos de *S. adstringens* podem ser exclusivos dos metabólicos secundários encontrados na planta como: taninos, alcaloides, amido, matérias resinosas, mucilaginosas, ácido tânico, estrifino, açúcar solúvel, flavonoide e flocafenos (GRANDI, 2014; SANTOS *et al.*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2001).

5.4 Análise da varredura do comprimento de onda

A partir dos resultados satisfatório para a detecção de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos de folhas de *Anadenanthera colubrina* e sementes de *Punica granatum*, por meio dos perfis eletroforéticos, os mesmos foram submetidos a uma varredura de comprimento de onda, a fim de identificar a melhor absorção dos inibidores de proteases presentes nos extratos, para posteriormente ser realizada a purificação em cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de HPLC.

O extrato enriquecido de *Glycine max* também passou pela varredura de comprimento de onda e posteriormente por purificação em sistema de HPLC, por estar sendo utilizado como padrão ouro para inibidores de proteases, uma vez que já se tem conhecimento da presença dos mesmos nesse grão (LEAL, 2010; CLEMENTE *et al.*, 2010).

A varredura no espectrofotômetro detectou três valores de melhor absorção, sendo o valor de 268 nm comum para os extratos enriquecidos das três espécies. O valor de 212 nm detectado para o extrato de sementes de *P. granatum* e o de 235 nm para o de folhas de *A. colubrina* e grãos de *G. max* (Figura 10).

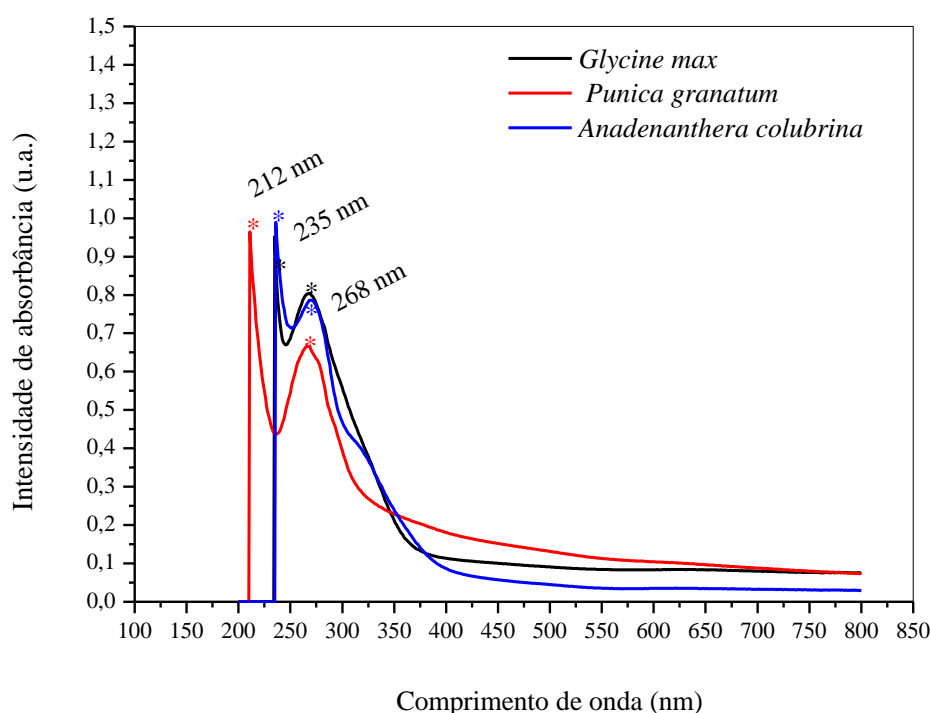


Figura 10: Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos a base de folhas de *A. colubrina* (—), sementes de *P. granatum* (—) e *G. max* grão (—) em espectrofotômetro. As amostras apresentaram curvas analíticas de absorção em 212 nm para *P. granatum*, 235 nm para *A. colubrina* e *G. max* e 268 nm para os extratos das três espécies, sendo monitorados de 199 a 800 nm. A varredura foi realizada com as amostras diluídas em água destilada e a temperatura ambiente.

A intensidade de absorbância do extrato enriquecido a base de folhas de *A. colubrina* demonstra uma concentração de proteínas igual ao do extrato de *G. max*, o que é observado na curva analítica do espectro, já o extrato de sementes de *P. granatum* apresentou uma intensidade de absorbância um pouco menor que os demais, sendo sua curva analítica um pouco mais baixa no ponto de absorção em comum aos três extratos, podendo estar relacionada com o seu grau maior de pureza, não demonstrando assim a absorção de outras possíveis proteínas, ou ainda a presença de uma menor concentração de inibidores de proteases.

Sendo assim, os picos que o espectro de absorção identificou para os extratos das três espécies, são característicos da absorção dos inibidores de proteases, podendo os mesmos estarem presentes nos extratos enriquecidos das folhas de *A. colubrina* e sementes de *P. granatum*, assim como no da *G. max* como já era esperado.

Os valores diferentes podem ser referentes a absorção dos dois sítios ativos dos inibidores de proteases, podendo ser a absorção em 268 nm referente a quimotripsina, que como demonstrado por estudos de Apura *et al.* (2012), está bem próxima da absorbância em UV de 250 nm da α -quimotripsina, isso devido sua constituição por vários aminoácidos aromáticos e quanto a absorção em 235 nm para extrato de folhas de *A. colubrina* e em 212 nm para o extrato de semente de *P. granatum*, a mesma se referir a absorbância da tripsina.

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos enriquecidos com inibidores de proteases

Após a realização da detecção de bandas proteicas no gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE e picos absorção, foram preparadas amostras a partir da diluição do sobrenadante dos extratos enriquecidos das espécies vegetais nos volumes de 50 μ L para 1 mL de água destilada para realização de uma corrida preliminar em sistema de HPLC a fim de identificar e analisar o comportamento das proteínas presentes nos extratos (Figura 11).

Essa corrida teve duração de 30 minutos e ocorreu com a utilização de uma coluna C₁₈ (2,5 cm x 4,6 mm) (Vydac 218TP), sob uma injeção de 50 μ L e com a Fase móvel de A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%; com eluição por gradiente: 0 a 100% de B.

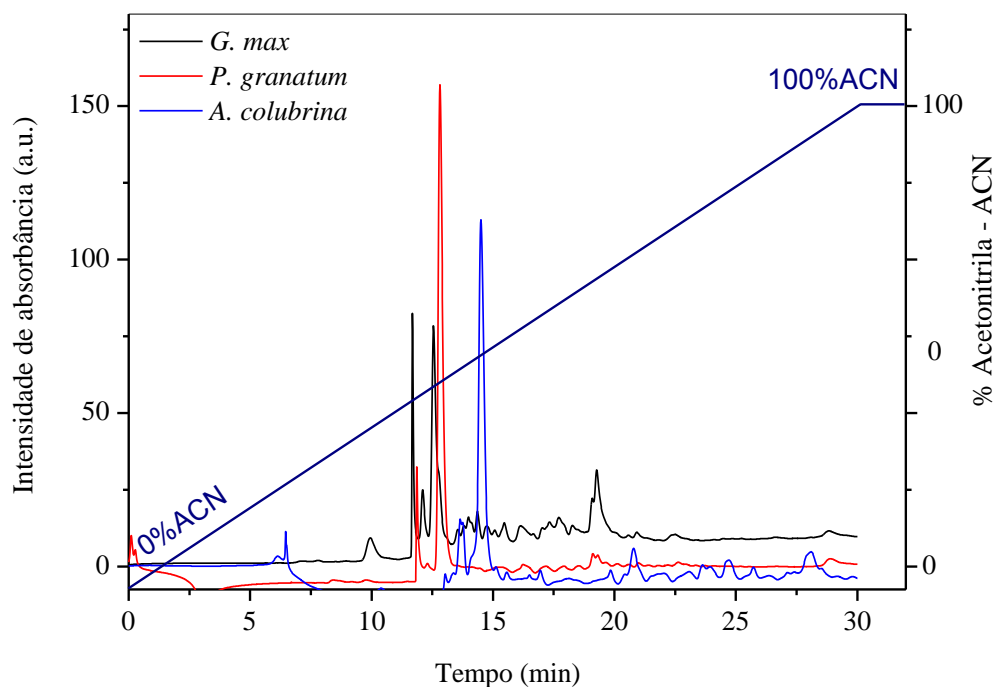


Figura 11: Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura das amostras dos extratos enriquecidos a base de folhas de *A. colubrina*, sementes de *Punica granatum* e grãos de *Glycine max*. Condições cromatográficas: Coluna utilizada C₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Vydac 218TP. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 30 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorbância de 260 a 400 nm.

Realizada uma análise prévia, os mesmos extratos foram submetidos a uma corrida final com a mudança no tempo de duração de 30 para 45 minutos, para uma detecção mais precisa. O cromatograma em HPLC referente ao extrato a base de folhas de *Anadenanthera colubrina* apresentou um perfil cromatográfico com comportamento um pouco diferente, com picos mais simétricos, sendo dois com intensidades semelhantes em tempos de retenção de 12 e 13 minutos, além de outros picos com intensidades diferentes em tempos de retenção de 28 e 40 minutos (Figura 12).

Os primeiros 2 picos com tempos de retenção de 12 e 13 minutos respectivamente, acredita-se serem referentes as isoformas de inibidores de proteases detectados no gel de poliácridamida na altura de 14 e 17 kDa. Enquanto ou outros 2 picos com intensidades diferentes que aparecem nos tempos de 28 e 40 minutos no cromatograma, supostamente representam as demais bandas aparentes no gel, impurezas nos extratos enriquecidos ou possíveis contaminantes não proteicos, além de ruídos oriundos da eluição da corrida.

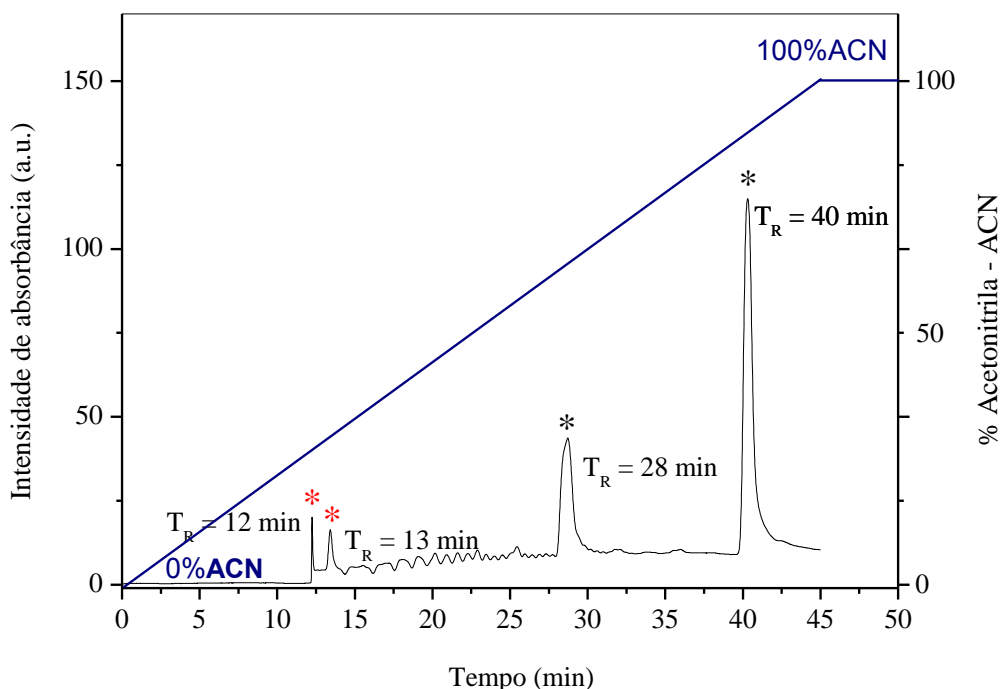


Figura 12: Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecido a base de folhas de *A. colubrina*. Condições cromatográficas: Coluna utilizada LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Supelcosil, 2,2 mL. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 45 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorbância de 260 a 400 nm. *Picos de absorção de inibidores de proteases.

O perfil cromatográfico em HPLC da única isoforma de inibidor de proteases detectada no gel de poliacrilamida referente ao extrato a base de sementes de *Punica granatum*, apresentou dois picos simétricos e bem evidentes com tempos de retenção em 12 e 13 minutos, e outros 2 picos em 28 e 40 minutos com outras intensidades (Figura 13).

Os picos que aparecem em 12 e 13 minutos supostamente podem ser os mesmos referentes ao inibidor de proteases detectados no gel de poliacrilamida em 14 kDa. O fato de aparecerem 2 picos no cromatograma referente a apenas uma banda de inibidor de proteases no gel, pode estar relacionado com a não divisão do dímero em duas isoformas no gel.

O cromatograma apresentou ainda outros 2 picos com intensidades diferentes em tempos de retenção de 28 e 40 minutos, que supostamente representam alguma proteína que não foi detectada pelo gel de poliacrilamida, devido a sua baixa sensibilidade comparada ao sistema HPLC para detecção de partículas, ou possível falha no processo de coloração do gel com o corante *Coomassie Blue*. Além da presença de possíveis impurezas do extrato e ruídos oriundos da eluição da corrida.

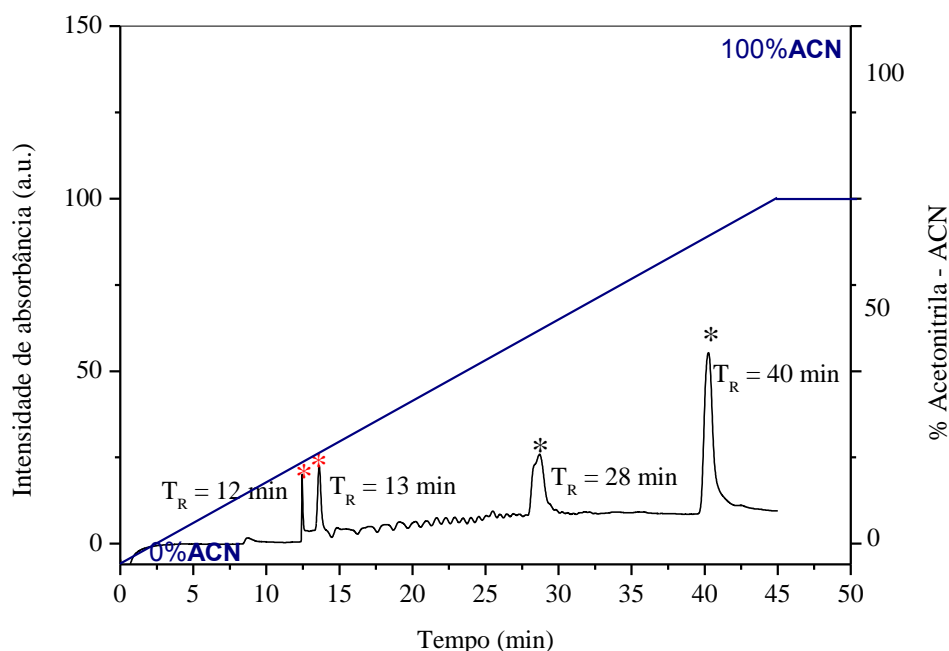


Figura 13: Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecido a base de sementes de *P. granatum*. Condições cromatográficas: Coluna utilizada LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Supelcosil, 2,2 mL. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 45 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorbância de 260 a 400 nm. *Picos de absorção de inibidores de proteases.

A análise cromatográfica em HPLC dos dímeros de inibidores de proteases detectadas no gel de poliácridamida referente ao extrato a base de *Glycine max* grão, apresentou um perfil cromatográfico com dois picos simétricos e com praticamente a mesma intensidade em tempos de retenção de 12 e 13 minutos, e ainda outros picos com intensidades diferentes em tempos de retenção de 28 e 40 minutos (Figura 14).

Os 2 primeiros também no tempo de retenção de 12 e 13 minutos, respectivamente simétricos, possivelmente representam na *G. max* os inibidores de proteases da família Bowman-Birk (BBI), com massas variando de 6 a 9 kDa comumente encontrada nas leguminosas (GARIANI; LEATHERBARROW, 1997), mas como já identificada em estudos descritos por Leal (2010), podem apresentar o peso molecular de 13 kDa, como demonstrado nos perfis eletroforéticos anteriormente.

Os picos nos tempos de retenção de 28 e 40 minutos demonstraram uma maior intensidade e simetria, podendo ser a representação das outras bandas aparentes no gel, uma vez que a *G. max* possui ampla distribuição de inibidores de proteases do tipo Kunitz e das lectinas em suas sementes, e apresentam, massas moleculares em torno de 21-22 e 30 kDa respectivamente (SONG; SUH, 1998; SHARON; LIS, 1990).

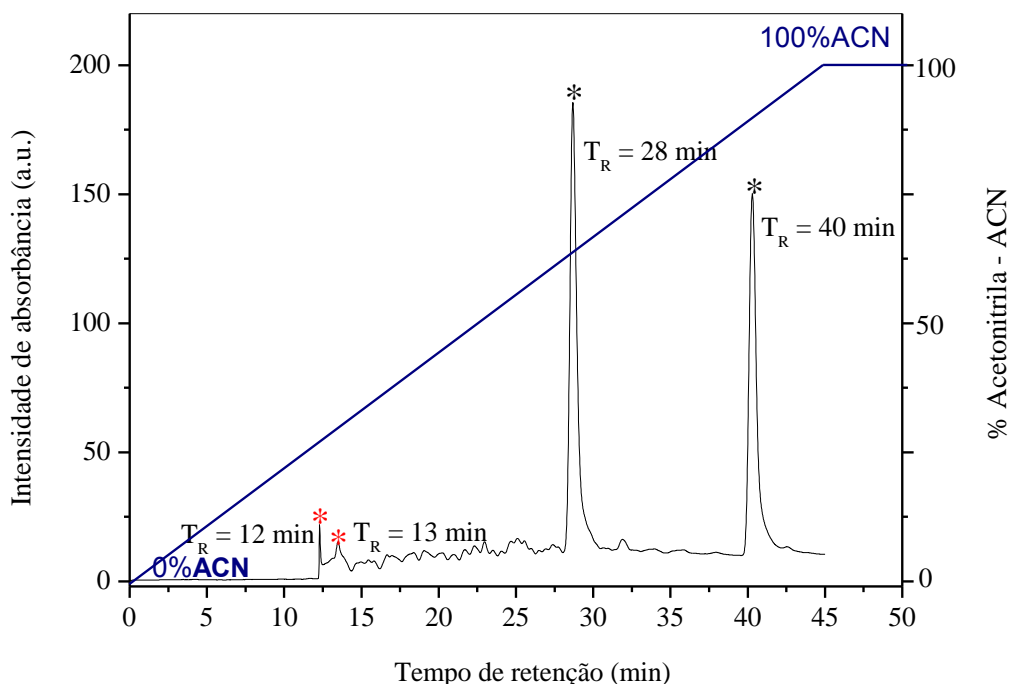


Figura 14: Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecidos a base de *G. max* grão. Condições cromatográficas: Coluna utilizada LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Supelcosil, 2,2 mL. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 45 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorvância de 260 a 400 nm. *Picos de absorção de inibidores de proteases.

Sendo assim, tendo o perfil cromatográfico do extrato de grãos de *G. max* como padrão de comparação, pode-se supor que os tempos de retenção de 12 e 13 minutos são referentes a presença de inibidores de proteases do tipo BBI. Os demais picos em 20 e 48 minutos, assim como descrito para as leguminosas, nos extratos de *A. colubrina*, *P. granatum* e *G. max*, possivelmente são relativos a inibidores de proteases do tipo Kunitz e lectina, assim como alguns tipos de impurezas presentes nos extratos.

Quanto a diferença da intensidade dos picos nos mesmos tempos de retenção nos cromatogramas tanto de *Anadenanthera colubrina* quanto no de *Punica granatum* comparados ao perfil da *Glycine max* grão pode estar relacionada ao potencial da atividade inibitória referente a cada um dos picos.

No que se refere a afinidade com a coluna, os 2 primeiros picos dos três extratos enriquecidos demonstraram uma hidrofobicidade de 40 e 43,3%, referente aos tempos de retenção de 12 e 13 minutos respectivamente, no gradiente de eluição disposto na corrida, ou seja, as proteínas referentes aos dois primeiros picos, presentes nos extratos enriquecidos são relativamente hidrofílicas e detentoras de baixo peso molecular, pequena massa, característica de inibidores de proteases do tipo BBI (FERREIRA, 2013; TOUIL *et al.*, 2008).

5.6 Distribuição do tamanho e potencial Zeta dos inibidores de proteases

Após a identificação das massas correspondentes aos inibidores de proteases oriundos dos extratos das folhas de *Anadenanthera colubrina* e das sementes *Punica granatum*, os mesmos foram submetidos a identificação da distribuição do tamanho e o potencial Zeta das partículas, para isso as amostras foram preparadas a partir do sobrenadante dos extratos enriquecidos diluídos em água destilada.

O potencial Zeta (ζ) de todas as amostras foi negativo conforme demonstrado na Tabela 1, como o esperado para proteínas por apresentarem carga negativa.

Tabela 1: Potencial Zeta e distribuição de tamanho das partículas dos inibidores de proteases.

Amostras	Potencial Zeta ζ (mV)		Tamanho (PdI)	
	5x	10x	5x	10x
<i>Anadenanthera colubrina</i>	-3,64	-4,79	0,618	0,675
<i>Punica granatum</i>	-19,2	-22,9	0,597	0,632

Considerando que a concentração de proteínas exerce um efeito no valor do potencial Zeta, o que aumenta o valor de ζ e indica a formação de partículas com maior densidade de carga superficial, as amostras com menor diluição demonstram uma concentração mais elevadas de inibidores de proteases (FAYAD *et al.*, 2015).

Assim, as amostras preparadas a partir do extrato enriquecido a base de folhas *A. colubrina* apresentou uma concentração maior de inibidores de proteases, uma vez que o potencial zeta de ambas as diluições tiveram valores maiores do que os apresentados pelas amostras a base de sementes de *P. granatum*.

Em relação a distribuição do tamanho das partículas de inibidores de proteases, o índice de polidispersão (PdI), foi relativamente semelhante em ambas amostras, mas com uma pequena diferença a mais para o extrato a base de folhas de *A. colubrina*, podendo essa distribuição de partículas estar relacionada com a maior concentração proteica. A eficiência foi comprovada por meio do gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE com a presença de bandas características de inibidores de proteases, além de perfis cromatográficos gerados pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que apresentaram tempos de retenção característicos para os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk (BBI) e os espectros de massas oriundos da cromatografia do tipo *eletrospray* que identificaram massas moleculares próximas as isoformas dos BBI, em análise das frações (picos) coletadas da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que a metodologia utilizada nesse trabalho se mostrou efetiva para a detecção, o isolamento e purificação de inibidores de proteases, em folhas de *Anadenanthera colubrina* (angico) e sementes de *Punica granatum* (romã).

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.R. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis, 1039 f., 1998.
- ALTSCHUL, S. V. S. A Taxonomic Study of the Genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, v. 193, p. 1-65, 1964.
- ANTAO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology Biochemistry** v. 43, p. 637-650, 2005.
- APURA, J.; MENDES, M.; UVA, MARIA. Estudo da estabilidade da α -quimotripsina numa gama alcalina de pH por absorção UV. Instituto Superior Técnico, p. 14, 2012.
- BAEK, J. M.; SONG, J. C.; CHOI, Y. D.; KIM, S. I. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 843-846, 1994.
- BERG, T. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions. **Current Opinion in Drug Discovery Development**, v. 11 p. 666-74, 2008.
- BERGERON, D.; NIELSEN, S.S. Partial characterization of trypsin inhibitors and N-terminal sequences of five trypsin isoinhibitors of great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1544-1549, 1993.
- BERTRAND, J.A.; OLEKSYSYN, J.; KAM, C.; BODUSZEK, B.; PRESNELL, S.; PLASKON, R.; SUDDAT, F.L.; POWERS, J.C.; WILLIAMS, L.D. Inhibition of Trypsin and Thrombin by Amino (4-amidinophenyl) methanephosphonate Diphenyl Ester Derivatives: X-ray Structures and Molecular Models. **Biochemistry**, v. 35, p. 3147–3155, 1996.
- BHATTARAM, A.V.; GRAEF, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**, v.9, p. 1-33, 2002.
- BLANCO, B.; SABORÍO, A.; GARRO, G. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* llantén mayor. **Tecnología en Marcha**, v. 21, p. 17-24, 2008.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-252, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 de março de 2004.
- BREGUEZ, G.S. **Síntese de peptídeos ricos em prolina e arginina e atividade Inibitória sobre o complexo proteolítico proteassoma 20s de mamíferos e do parasito *Schistosoma mansoni***. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.

CATE, J. M.; MARSH, P. D. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 73, p. 695-703, 1994.

CAVALLAZZI, M. L. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. 2006. 144f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHEN, P.; ROSE, J.; LOVE, R.; WEI, C. H.; WANG, B. C. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 1990-1994, 1992.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829- 837, 2004.

CLEMENTE, A., SONNANTE, G., DOMONEY, C. Bowman–Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, p. 358–373, 2011.

CLEMENTE, A.; MORENO, F. M.; MANZONO, M. del C. M.; JIMENEZ, E.; DOMONEY, C. The cytotoxic effect of Bowman–Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 396-405, 2010.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Vol. 1. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1926.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, 2008.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 564-582, 1999.

DESHIMARU, M., YOSHIMI, S., SHIOI, S., AND TERADA, S. Multigene family for BowmanBirk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 1279-1286, 2004.

DESMARCHELIER, C.; RIMAO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antiooxidany and free radical scavenging activities in exctracts from medical trees used in the ‘Caatinga’ region in the northastern Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2ª ed. England, 2002.

DUARTE, S.M. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteíno protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

EFFRAIM, K.D.; JACKS, T.W.; SODIPO, O.A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **Journal Biomedical Research**, African, v.6, p. 21-25, 2001.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 381-391, 2005.

FAYAD, S. J.; RAMOS, B.G. Z.; SOLDI, V.; MINATTI, E. Nanopartículas de proteína isolada de soja em água: efeito da força iônica e das concentrações de proteína e surfactante. **Química Nova**, v. 38, p. 91-96, 2015.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERREIRA, C. **Atividade anti-angiogênica de inibidores de tripsina em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus***. 2013, 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

FIELDS, C., MALLEE, P., MUZARD, J., LEE, G.U. Isolation of Bowman-Birk—inhibitor from soybean extracts using novel peptide probes and high gradient magnetic separation. **Food Chemistry**, v.134, p.1831–1838, 2012.

FRANCO, L.O.; GROSSI DE SÁ, M.; SALES, M.P.; MELLO, V.L.; OLIVEIRA, A.S.; RIGDEN, D.J. Overlapping binding sites for trypsin and papain non a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**, v. 49, p. 335-341, 2002.

GARIANI, T.; LEATHERBARROW, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **Journal of Peptide Research**, v. 49, n. 6, p. 467-475, 1997.

GOMES, C. E.; BARBOSA, A. E.; MACEDO, L. L.; PITANGA, J. C.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology Biochemistry**, v. 43, p. 1095-1102, 2005.

GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 13^a ed. São Paulo: Nobel, 446p, 2007.

GONZALEZ, F.; SILVA, M. A survey of plants with antifertility properties described in the South American folk medicine. **Abstract Princess Congress**, v. 10-13, p. 20, 1987.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J.S.; OLIVER-SALVADOR, M. del C. Production of plant proteases in vivo and in vitro - a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 983–996, 2011.

GRANDI, T. S. M. Tratado das plantas medicinais [recurso eletrônico]: mineiras, nativas e cultivadas. 1^a ed. Belo Horizonte: **Adaequatio Estúdio**, 1204 p., 2014.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; HAMES, B. D. Gel electrophoresis of proteins: A Practical Approach, 3^a ed., **Oxford University Press**, Oxford, p. 13-33, 1998.

HAMMOND, R. W.; FOARD, D. E.; LARKINS, B. A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 15, p. 9883-9890, 1984.

HEAL, W.P.; WICKRAMASINGHE, S.R.; TATE, E.W. Activity based chemical proteomics: profiling proteases as drug targets. **Current Drug Discovery Technology**, v. 5, p. 200-212, 2008.

HEIBGES, A., SALAMINI, F., AND GEBHARDT, C. Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 269, p.c535-541, 2003.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C.B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 12(Supl. 1), p.1-2, 2002.

JENSEN, B.; UNGER, K. K.; UEBE, J.; GEY, M.; KIM, Y. M.; FLECKER, P. Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performace capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase inhibitors. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 33, p. 171-185, 1996.

JOSÉ, M. O. de M. A. **Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagas filamentosos e seu papel na interação planta-inseto**. 2002. 108p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 467-471, 2000.

KOWALSKI, D.; LASKOWSKI, M., Jr. Chemical-enzymatic insertion of an amino acid residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **Biochemistry**, v. 15, p. 1309-1315, 1976.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. **Pathology Research Practise**, v. 204, p. 491-500, 2008.

KUMAR, K.; KANSAL, R.; SUBRAHMANYAM, B.; KOUNDAL, K.R.; MIGLANI, K.; GUPTA, V.K. A Bowman-Birk protease inhibitor with antifeedant and antifungal activity from *Dolichos biflorus*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1887-1903, 2013.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, p.1153-4, 2000.

LASKOWSKI, M.J.; QASIM, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysics Acta**, v. 1477, p. 324-337, 2000.

LASTRES, H. M. M.; ALBAGLI, S.; LEMOS, C.; LEGEY, L. Desafios para Políticas na Era do Conhecimento: uma visão fluminense. Rio de Janeiro, 4ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2001.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronisc Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109, 2002.

LEAL, S. C. **Purificação preparativa de inibidores Bowman-Birk, quantificação em alimentos e características imunogênicas dos inibidores de *Glycine max* e da *Macrotyloma axillare***. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

LIU, B.; SCHOFIELD, C. J.; WILMOUTH, R. C. Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 24024-24035, 2006.

LOPES, J.L. de S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

LÓPEZ, R.E. da S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química. Nova**, v. 33, n. 7, p.1541-1548, 2010.

LORENZI, H.: Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas e Árvores Nativas do Brasil. **Nova Odessa**, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the bowman-birk inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 94-118, 2008.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14(Supl. 1), p. 40-44, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MARCHESE, J.A.; MING, L.C.; FRANCESCHI, L.; CAMOCHENA, R.C.; GOMES, G.D.R.; PALADINI, M.V.; CAPELIM, D.; MARCHESE, C.F. Medicinal plants used by “Passo da Ilha” rural community in the city of Pato Branco, southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.4, p.691-700, 2009.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2ª ed. Imprensa Universitária/Edições UFC, Fortaleza, 344p, 2000.

McGURL, B.; MUKHERJEE, S.; KAHN, M.; RYAN, C. A. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfafa leaves (*Medicago sativa* var. Vemema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. **Plant Molecular Biology**, v.27, n. 5, p. 995-1001, 1995.

MEDDLETON, E. Jr.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 4, p. 673-751, 2000.

MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 541-546, 1991.

MIGLIOLO, L. **Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenathera pavonina* L. para enzimas cisteínas e serícas**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

MINISTÉRIO da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

MIYAUCHI, Y; YOSHIMOTO, T; MINAMI, K. Extractives from heartwood of *Piptadenia* sp. Extractives from the heartwood, IX. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 22, p. 47-50, 1976.

NAKAHIRA, M. **Caracterização físico-química e estrutural do SbKI, um inibidor de serinoproteases de sementes de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*)**. 2004. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

NODA, Y.; KANEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.166-71, 2002.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequence of trypsin chymotrypsin inhibitors (AI, AII, BI and BII) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v. 94, n. 2, p. 589-599, 1983.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 13, p. 83-92, 2003.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of Bowman-Birk type. **Journal of Biochemistry**, v. 100, n. 4, p. 975-983, 1986.

OLIVEIRA, M. E. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos no inibidor proteico da *Macrotyloma axillare***. 2004. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

PARNHAM, M.J.; KESSELRING, K. Rosmarinic acid. **Drugs of the Future**, Barcelona, v.10, p.756-757, 1985.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v. 47, p. 403-435, 1992.

PAULA, R. C. M.; BUDD, P. M.; RODRIGUES, J. F. *Polymer International*, v. 44, p. 55, 1997.

PEREIRA, Z.V.; GOMES, C.F.; LOBTCHENKO, G.; GOMES, M.E.S.; SIMÕES, P.D. de A.; SARUWATARI, R.P.S.; RIGO, V.F.; CORDEIRO, W. do P. Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 1, p.249-251, 2007.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v.4, n.3, p.337-360, 1995.

PERONA, J. J.; HEDSTROM, L.; RUTTER, W. J.; FLETTERICK, R. J. Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. **Biochemistry**, v. 34, p. 1489-1499, 1995.

PETERSENA, M.; SIMMONDSB M. S. J. Molecules of Interest: Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v.62, p.121–125, 2003.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, Ö. C.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.

PRAKASH, B.; MURTHY, M. R. N.; SREERAMA, Y. N.; RAO, D. R.; GOWDA, L. R. Studies on simultaneous inhibition of trypsin and chymotrypsin by horsegram Bowman-Birk inhibitor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 22, p. 545-554, 1997.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 189-198, 2001.

RAMALHO, P. E. Angico-Branco: Taxonomia e Nomenclatura. **Circular Técnica, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 56, 2002.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

READ, M.N.G.R. Proteinase Inhibitors. **Elsevier Science**, p. 301-335, 1986.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry** v. 3, p. 159-169, 1997.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A.J. TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Letters**, v. 504, p. 41-44, 1990.

RODENBURG, K.W.; VARALLYAY, E; SVENDSON, I.; SVENDSON, B. Arg-27, arg127 and arg-155 in the a-trefoil protein barley a-amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley a-amylase. **Biochemical Journal**, v. 309, p. 969-976, 1995.

ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 22, n. 5, p. 783-792, 1993.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.28, p.425–449, 1990.

RYAN, C.A. **Proteinase inhibitors**. In A. Marcus, ed. *The Biochemistry of Plants*, v. 6. Academic Press: New York, p. 351-370, 1981.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and Molecular Pathology**, v.93, n.3, p.428-433, 2012.

SAMMOUR, R.H.A. Isolation and characterization of four isoinhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 207–215, 2006.

SANTOS, A. G. dos; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Fitocosméticos. Farmacognosia. Coletânea científica. 2011. p. 19-68. in: SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P. de; LOPES, N. P. (organizadores). Farmacognosia: coletânea científica. 372p.: il. Ouro Preto. Editora UFOP, 2011.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins-a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v.4, p. 3198-208, 1990.

SILVA, A. G.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 1998.

SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. 2ª ed. Atual - São Paulo: SENAC São Paulo, p.35-36, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 1, p. 13-26, 2001.

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, p. 347-363, 1998.

THEODORO JÚNIOR, O. A. **Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal *EcTI*, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57B16**. 2014. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae)**. 2002. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

TONELLI, F. C. P. ; JÚNIOR, N. M. C. ; PARREIRA, A. G. ; GONCALVES, D. B. ; SILVA, J. A. ; GRANJEIRO, P. A. Métodos de extração de inibidor de protease de sementes de *Albizia niopoides*. In: V JORNADA ACADÊMICA INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA, 2015, v.1, n.1, p.11-12, Divinópolis. **Anais eletrônicos da V JABQI**. Divinópolis: Universidade Federal de São João del Rei, 2015.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. **Anadenanthera: visionary plant of ancient South America**. USA: Routledge, p. 95-104, 2006.

TOUIL, T.; CIRIC, B; VENTUR, E; SHINDLER, K., S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. Bowman–Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences** v.271, p.191–202, 2008.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas - Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**. 1ª edição Versão Eletrônica, 2009.

VENTURA, P. A. O; JESUS, J. P. O.; NOGUEIRA, J. R. de S.; GALDOS-RIVEROS, A. C. Análise fitoquímica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de diferentes tipos de extratos de *Plantago major* L. (Plantaginaceae). **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 28, p. 33-39, 2016.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the midgut digestive 56 proteinase activity of the two spot ladybird (*Adalia bipunctata*) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 173-180, 1997.

ZANI, M.L.; MOREAU, T. Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. **Biochimie**, v.92, n.11, p.1689-1704, 2010.